

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie



**Heterologní exprese a purifikace potkaní formy  
cytochromu P450 1A1**

Heterologous expression and purification of rat cytochrome P450 1A1

*Bakalářská práce*

Michaela Vlková  
Školitel: RNDr. Věra Černá, Ph.D.

Praha 2013

**Prohlášení:**

*Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Věry Černé, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.*

V Praze, 2013

Podpis:

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat svému školiteli **RNDr. Věře Černé, Ph.D.** za profesionální vedení, trpělivost, cenné rady a také za čas, který se mnou strávila při vyhotovení mé bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat **Mgr. Janu Milichovskému** za rady, ochotu, poskytnutý materiál a pomoc při časově náročné práci v laboratoři.

Moje poděkování také patří **Mgr. Martinu Stráňavovi** za jeho pomoc při práci v laboratoři i poskytnutý materiál pro moji práci.

Zároveň děkuji celému kolektivu Laboratoře molekulární karcinogeneze a vývoje léčiv za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

# Abstrakt

Cytochrom P450 1A1 patří do „superrodiny“ cytochromů P450 (CYP). Je to extrahepatální enzym, který se podílí na detoxikačním metabolismu mnoha xenobiotik, ale bohužel také zároveň patří mezi nejvýznamnější zástupce CYP účastníci se aktivace prokarcinogenů.

Hlavním cílem této práce bylo pomocí heterologní exprese připravit a izolovat potkaní cytochrom P450 1A1 v dostatečném množství a čistotě.

V rámci této práce byly připraveny dva vektory nesoucí gen pro potkaní cytochrom P450 1A1 vložené do účinného expresního plasmidu pCW. Funkčnost připravených vektorů byla ověřena expresí CYP1A1 a měřením CO diferenčních spekter. Zjistilo se, že pouze jeden z vektorů poskytoval nativní protein. Tento vektor byl transformován do buněk bakterií *E.coli* kmene DH5 $\alpha$ , DH5 $\alpha$  s vneseným plasmidem pHg1 a DH5 $\alpha$  s vneseným plasmidem pGRO7. Byly testovány různé podmínky produkce CYP1A1: růstová média (LB a TB médium), čas produkce (24 a 48h), koncentrace IPTG (0,5mM a 1mM) a přítomnost ALA. Nejvyšší exprese bylo dosaženo v buňkách *E.coli* DH5 $\alpha$  kultivovaných v modifikovaném TB médiu po 48 hodinách exprese a při teplotě 30°C (indukce při 0,6 - 0,8 OD<sub>600</sub> 0,5mM IPTG s přídatkem 0,5mM ALA). Úspěšně se podařilo exprimovat také CYP1A1 bez ALA za pomoci plasmidu pHg1, což velmi sníží ekonomické náklady celé produkce. Membrány buněk obsahující CYP1A1 byly získány frakční centrifugací a CYP1A1 byl dále purifikován pomocí afinitní chromatografie na Ni-NTA agarose. Bylo zjištěno, že v tomto případě není nutné při izolaci cytochromu P450 1A1 použít inhibitor  $\alpha$ -NF, který byl ve většině prací zabývajících se purifikací CYP podrodiny 1A přidáván jako stabilizující látka. Purifikovaný CYP1A1 je enzymově aktivní, což bylo potvrzeno reakcí se 7-ethoxyresorufinem jako markerovým substrátem.

Klíčová slova: rekombinantní potkaní CYP1A1, heterologní exprese, izolace, EROD aktivita

# Abstract

Cytochrome P450 1A1 belongs to "superfamily" of cytochromes P450 (CYPs). It is an extrahepatic enzyme that takes a part in detoxification metabolism of many xenobiotics but unfortunately also it is one of the most important representatives of CYPs involved in the activation of procarcinogens.

The main aim of this bachelor thesis was to prepare and purify cytochrome P450 1A1 in sufficient quantity and purity by heterologous expression.

Two different vectors, which were constructed by inserting the gene for rat cytochrome P450 1A1 in efficient expression plasmid pCW, were prepared during this bachelor thesis. Functionality of prepared vectors was verified by measuring the expression of CYP1A1 and CO difference spectra. It was found that only one of the vectors mentioned above provides native protein. This vector was transformed into *E. coli* cells of strain DH5 $\alpha$ , DH5 $\alpha$  with the inserted plasmid pHg1 and DH5 $\alpha$  with inserted plasmid pGRO7. Various conditions of CYP1A1 production were tested: growth media (LB or TB medium), the time of production (24 and 48h), the concentration of IPTG (0.5mM and 1mM) and the presence of ALA. The highest expression level was achieved in *E. coli* DH5 $\alpha$  cells cultivated in a modified TB medium after 48 hours of production and at 30°C (induction at OD<sub>600</sub> 0.6 to 0.8 by 0.5mM IPTG, with the addition of 0.5mM ALA). The expression of CYP1A1 using plasmid pHg1 was also successful, leading to significant reduction of the economic costs of production. Membranes containing CYP1A1 were obtained by fractional centrifugation and CYP1A1 was further purified by affinity chromatography on Ni-NTA agarose. It was realized that the addition of inhibitor  $\alpha$ -NF, used in most of the studies dealing with purification of CYP subfamily 1A, wasn't necessary in this case because no damage of protein was observed. The purified CYP1A1 is enzymatically active, which was confirmed by reaction with a marker substrate, 7-ethoxyresorufin.

Keywords: recombinant rat CYP1A1, heterologous expression, isolation, EROD activity

# Obsah

<i>Seznam zkratek</i> .....	9
<b>1 Úvod</b> .....	11
1.1 Cytochromy P450.....	12
1.1.1 Názvosloví cytochromů P450.....	13
1.1.2 Funkce cytochromů P450 v organismu .....	14
1.1.3 Reakční mechanismus cytochromu P450 .....	16
1.1.4 Cytochromy P450 rodiny 1 .....	17
1.1.4.1 Cytochrom P450 1A1 .....	18
1.2 Heterologní exprese .....	19
1.2.1 Heterologní exprese CYP1A1 .....	21
1.2.2 Expresní vektory .....	22
1.2.2.1 Plasmid pET- 22b .....	22
1.2.2.2 Plasmid pCW.....	23
<b>2 Cíl práce</b> .....	25
<b>3 Materiál a metody</b> .....	26
3.1 Použité přístroje .....	26
3.2 Použitý materiál a chemikálie .....	28
3.3 Použité plasmidy, bakteriální buňky a reduktasa .....	30
3.4 Použité metody.....	31
3.4.1 Příprava agarových ploten s antibiotikem .....	31
3.4.2 Transformace bakterií <i>Escherichia coli</i> tepelným šokem.....	31
3.4.3 Přeočkování bakteriálních buněk metodou „single-cell“.....	32
3.4.4 Kultivace buněk <i>E.coli</i> v bakteriálních růstových médiích .....	32
3.4.4.1 Kultivace buněk <i>E.coli</i> v malém objemu bakteriálních růstových médií.....	33

3.4.4.2	Kultivace buněk E.coli ve velkém objemu bakteriálních růstových médií.....	34
3.4.5	Polymerasová řetězová reakce.....	34
3.4.6	Srážení produktu PCR isopropanolem.....	35
3.4.7	Dvojité štěpení pomocí endonukleas BamHI a HindIII.....	36
3.4.8	Dvojité štěpení pomocí endonukleas NdeI a XhoI.....	37
3.4.9	Horizontální agarosová elektroforéza.....	38
3.4.10	Určení koncentrace a čistoty DNA.....	39
3.4.11	Izolace DNA z agarosového gelu pomocí kitu „JET quick - Gel Extraction Spin Kit“.....	40
3.4.12	Ligace.....	40
3.4.13	Minipreparace plasmidové DNA.....	41
3.4.14	Midipreparace plasmidové DNA.....	42
3.4.15	Příprava vzorků DNA na sekvenaci.....	44
3.4.16	Izolace CYP 1A1.....	44
3.4.16.1	Příprava sféroplastů.....	45
3.4.16.2	Dezintegrace sféroplastů.....	46
3.4.16.3	Příprava membránové frakce.....	46
3.4.16.4	Solubilizace proteinů z bakteriální membrány.....	46
3.4.16.5	Chromatografie na koloně Ni-NTA.....	46
3.4.16.6	Zahuštění finálního preparátu.....	47
3.4.17	SDS elektroforéza.....	47
3.4.18	Western blotting.....	49
3.4.18.1	Přenos proteinů z gelu na membránu.....	49
3.4.18.2	Detekce cytochromu P450 1A1 pomocí králičí protilátky.....	50
3.4.19	Stanovení koncentrace cytochromu P450.....	50
3.4.20	Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA.....	51
3.4.21	Stanovení ethoxyresorufin-O-deethylasové aktivity.....	52

<b>4</b>	<b>Výsledky</b>	<b>54</b>
4.1	Příprava expresních vektorů	54
4.1.1	pCW/1A1mod_histag	54
4.1.2	pCW/1A1wt_histag	57
4.2	Ověření připravených vektorů sekvenací	59
4.2.1	Sekvenace vektoru pCW/1A1mod_histag	59
4.2.2	Sekvenace vektoru pCW/1A1wt_histag	60
4.3	Exprese cytochromu P450 1A1	60
4.3.1	Exprese cytochromu P450 pomocí vektoru pET/1A1wt_histag	60
4.3.2	Exprese cytochromu P450 1A1 pomocí vektoru pCW/1A1wt_histag	63
4.3.3	Exprese cytochromu P450 1A1 pomocí vektoru pCW/1A1mod_histag	63
4.4	Izolace potkaního cytochromu P450 1A1	68
4.4.1	První izolace CYP1A1	68
4.4.2	Druhá izolace CYP1A1	72
4.5	Aktivita izolovaných CYP 1A1	74
<b>5</b>	<b>Diskuse</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Závěr</b>	<b>78</b>
	<i>Seznam použité literatury</i>	<b>79</b>



## Seznam zkratek

$\alpha$ -NF	$\alpha$ -naftoflavon
A	absorbance
AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky (Aryl hydrocarbon receptor)
ALA	$\delta$ -aminolevulová kyselina
B[a]P	benzo[a]pyren
BCA	4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitro blue tetrazolium
BSA	hovězí sérový albumin
CPR	cytochrom P450 oxidoreduktasa
CYP, P450	cytochrom(y) P450
CYP1A1	cytochrom P450 forma 1A1
DLPC	1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-fosfocholin
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
E-911	emulgen 911
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ER	7-ethoxyresorufin
EROD	ethoxyresorufin-O-deethylasová aktivita
Exp Y	rozsah osy Y při měření diferenčního spektra
FMO	flavinové monooxygenasy
GIT	gastrointestinální trakt
GSH	glutathion
HAc	octová kyselina
HCAs	heterocyklické aromatické aminy
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamonio]-1-propan-sulfonát
IPTG	isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktopyranosid
LB	Luria Broth

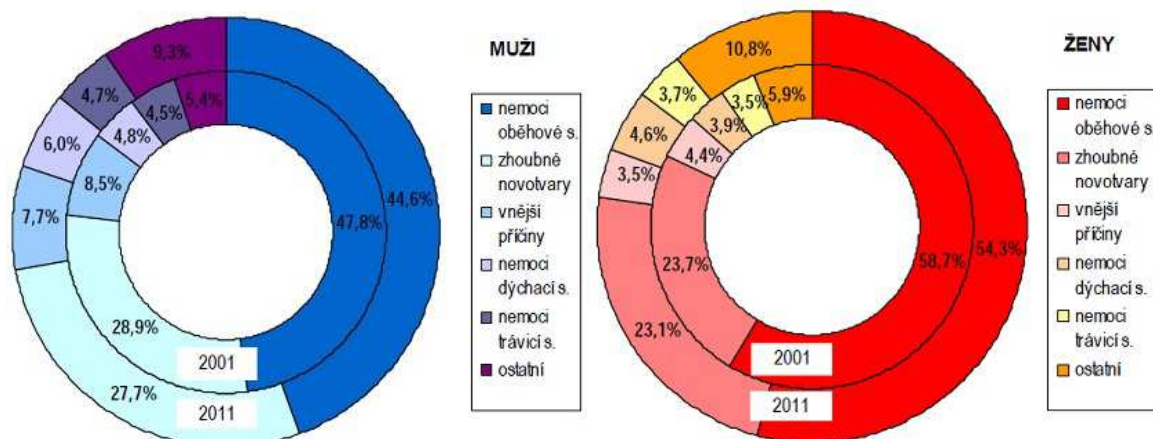
MAO	monoaminoxidasy
MQ	deionizovaná voda
MES	2-morfolino-ethansulfonová kyselina
MFO	mikrosomální systém monooxygenas se smíšenou funkcí
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NADP(H)	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
NAT	N-acetyltransferasy
Ni-NTA	nitrilotrioctová kyselina (NTA) spojená s 6% agarósovou pryskyřicí nabitou Ni <sup>2+</sup>
OD <sub>600</sub>	optická denzita při 600 nm
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PEG	polyethylenglykol
PCR	polymerasová řetězová reakce
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PVDF	polyvinylidenfluorid
RPM	otáčky za minutu („revolutions per minute“)
SDS	dodecylsulfát sodný
TB	Terrific Broth
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa
v/v	„volume/volume“, objem/objem
w/v	„weight/volume“, hmotnost/objem
wt CYP1A1	„wild type“, nemodifikovaný cytochrom P450

# 1 Úvod

S vývojem nových technologií se v životním prostředí začalo hromadit značné množství sloučenin, cizorodých látek (xenobiotik), se kterými se organismy dříve neselekávaly. Na zdravotní stav lidské populace mají povětšinou negativní vliv. Zejména si musíme uvědomit značný karcinogenní potenciál řady látek, ať již cíleně produkovaných a využívaných v průmyslu nebo zemědělství, či látek, které jsou přirozenou součástí životního prostředí<sup>[1]</sup>.

Rakovina je nejrozšířenější smrtelná nemoc s výjimkou onemocnění kardiovaskulárního systému (Obr. 1, str. 12)<sup>[2]</sup>. Výzkum chemické karcinogeneze je rychle se rozvíjející oblast. Z výsledků výzkumu lidských nádorových onemocnění vyplývá, že 70 až 90 % z nich je způsobeno kontaktem s chemickými látkami, ať už přírodního nebo syntetického původu<sup>[3]</sup>. Tyto látky se vytvářejí při spalování fosilních paliv, dřeva a jiných organických materiálů. Jsou obsaženy i ve výfukových plynech, v cigaretovém kouři a v potravinách, připravovaných grilováním na dřevěném uhlí<sup>[4]</sup>. Riziko poškození organismu je závislé na toxicitě látky, na její koncentraci a době působení<sup>[5]</sup>. Xenobiotika mohou být pro organismus nebezpečná, a proto je snahou většiny z nich dané látky přeměňovat a odstraňovat z organismu. Často mají tyto látky hydrofobní charakter s tendencí akumulace v organismu. Proto je nejprve nutná jejich přeměna (biotransformace) na polárnější metabolity, které se snáze vylučují. U živočichů dochází k eliminaci xenobiotik ve dvou hlavních fázích<sup>[1,5]</sup>. V první fázi, jinak nazývané derivatizační, probíhá připojení reaktivních skupin, a tím dochází ke zvýšení polaritě xenobiotik. Druhá fáze, nazývaná též konjugační, je zaměřena na spojení polárních endogenních látek s xenobiotiky polarizovanými v první fázi. Tímto krokem se ještě zvýší polarita původně hydrofobní molekuly a usnadní se tím její vyloučení z organismu. Hydrofilnější metabolity však nemusí být jen netoxické, biologicky inertní látky, ale naopak se může jednat o látky značného biologického významu. Místo detoxikace dané látky tedy může docházet k její aktivaci. Takovou metabolickou aktivaci vyžaduje řada léčiv, ale aktivováno je též 98 % genotoxických karcinogenů<sup>[5]</sup>.

Klíčovým enzymovým systémem první fáze biotransformace je mikrosomální systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO), v němž roli terminální oxidasy plní cytochrom P450 (CYP). Ten sám o sobě není funkční, ale potřebuje NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu (CPR), která slouží jako dělič elektronového páru<sup>[6]</sup>.



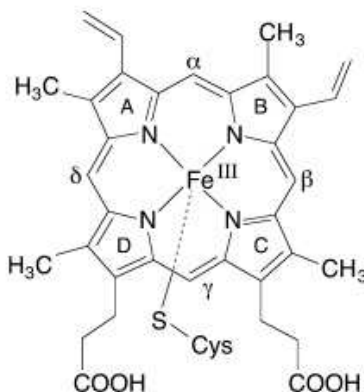
Obr. 1: Graf úmrtí podle příčin smrti v ČR v letech 2001 a 2011<sup>[2]</sup>.

## 1.1 Cytochromy P450

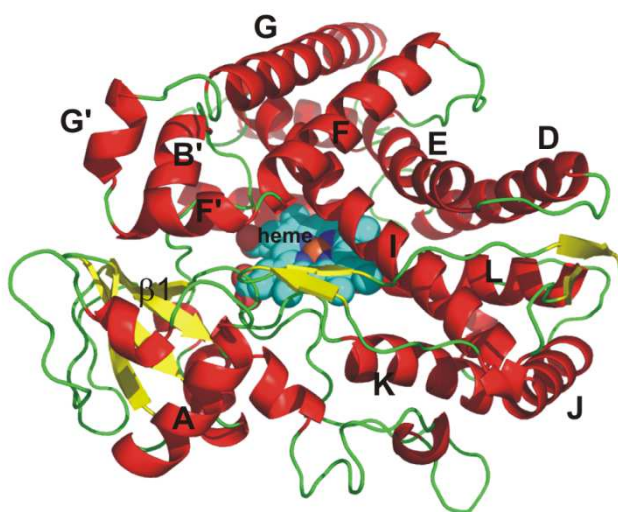
V 50. letech 20. století byla objevena v mikrosomální frakci savčích jater do té doby neznámá třída proteinů s enzymovou aktivitou. Na výzkumu CYP se nezávisle podílela řada vědců. Mezi ně se například řadí americký vědec D. Garfinkel nebo německý chemik M. Klingenberg. Oba zkoumali spektrální vlastnosti cytochromů P450. M. Klingenberg si všiml širokého absorpčního pásu při vlnové délce 450 nm, který protein vykazuje v redukované formě v přítomnosti oxidu uhelnatého<sup>[7,8]</sup>. V 60. letech 20. století S. Omura a R. Sato tento pigment charakterizovali jako nový mikrosomální hemoprotein a na základě podobnosti povahy vazby hemu cytochromů b a podle netypického maxima Soretova pásu jej pojmenovali jako cytochrom P450<sup>[9,10]</sup>.

Cytochromy P450 jsou hemoproteiny, jejichž sekvenční identita je často velmi nízká (může být nižší než 20 %). Rostoucí počet krystalových struktur P450 však ukazuje, že tato neobvyklá variabilita nevylučuje zachování jejich obecné topografie a prostorového uspořádání. Nejvíce konzervovaná prostorová struktura se nachází v oblasti kolem hemu<sup>[11]</sup>. V aktivním centru enzymu je přítomna prosthetická skupina - protoporfyrin IX. Ta je vázána jednak hydrofobními silami a zároveň přes atom železa prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu (Obr. 2, str. 13). Tento konzervovaný cystein je pátým ligandem hemového železa. Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody<sup>[6,12]</sup>. Jedná se o proteiny, které obsahují převážně  $\alpha$ -helixy. Ty jsou v prostorové struktuře CYP konzervovány a bývají označovány písmeny A-L. Ve styku s hemem jsou helixy I a L; helixy B, F a I jsou ve styku se substrátem (Obr. 3, str. 13)<sup>[13]</sup>.

Eukaryotické cytochromy jsou N koncem zakotveny v membránách, a to nejčastěji endoplasmatického retikula, ale mohou se vyskytovat i v membráně mitochondrií, golgiho aparátu a byly nalezeny i v plasmatické membráně. Na rozdíl od toho cytochromy prokaryotické jsou rozpustné proteiny přítomné v cytoplasmě<sup>[14,15,16]</sup>.



**Obr. 2:** Prosthetická skupina cytochromů P450 - protoporfyrin IX vázaný přes centrální atom železa k cysteinovému zbytku<sup>[12]</sup>.



**Obr. 3:** Prostorová struktura cytochromu P450 (CYP2C9) s barevně odlišenými prvky sekundární struktury, s označenou pozicí hemu (modře) a s  $\alpha$ -helixy označenými pomocí písmeny A - L<sup>[13]</sup>.

### 1.1.1 Názvosloví cytochromů P450

Cytochromy P450 patří do „superrodiny“ enzymů, která je široce rozšířena ve všech formách života, včetně bakterií, rostlin, hub, hmyzu a savců<sup>[17]</sup>. V organismech se vyskytují v mnoha různých formách, které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin

podle stupně homologie primární struktury (pořadí aminokyselin) jejich proteinových molekul. Rodiny cytochromů P450 jsou označovány prvním číslem za zkratkou P450. Do společné rodiny se řadí proteiny, jejichž primární struktura má homologii vyšší než 40 %. Následující velké písmeno označuje podrodinu. Do stejné podrodiny patří proteiny, které mají homologii aminokyselinové sekvence vyšší než 55 %. Jednotlivé izoenzymy jsou pak označeny číslem za písmenem podrodiny <sup>[18,19]</sup>. Například CYP1A1 patří do rodiny 1 a podrodiny A.

Se vzrůstajícím počtem osekvenovaných genomů se neustále zvyšují i počty nově objevených a popsanych cytochromů. V současné době je pojmenováno 12 456 cytochromů P450 (Tab. 1). Dalších více než 6000 objevených doposud své jméno nemá <sup>[20]</sup>.

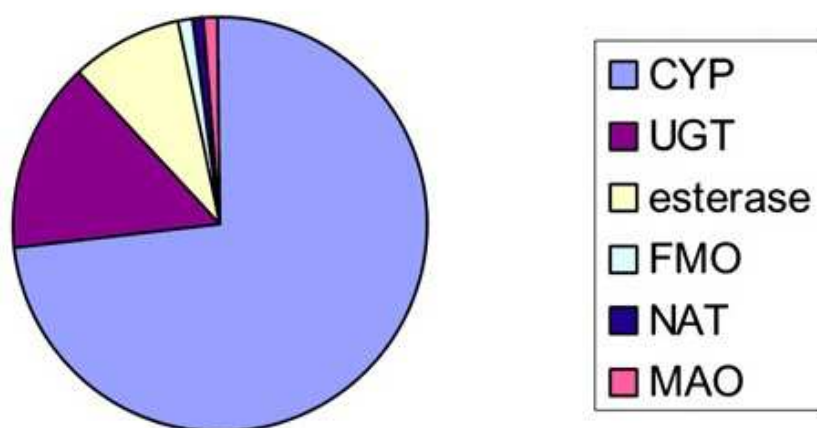
**Tab. 1:** Počet cytochromů P450 a jejich rodin u jednotlivých živých organismů <sup>[20]</sup>.

<b>Živé organismy</b>	<b>Počet CYP</b>	<b>CYP rodiny</b>
<b>Zvířata</b>	4088	156
<b>a) Hmyz</b>	2137	67
<b>b) Obratlovci</b>	1461	18
<b>c) Bezobratlí (kromě hmyzu)</b>	490	71
<b>Rostliny</b>	4,267	126
<b>Houby</b>	2,784	399
<b>Prvoci</b>	247	62
<b>Bakterie</b>	1042	333
<b>Archebakterie</b>	26	13
<b>Viry</b>	2	2

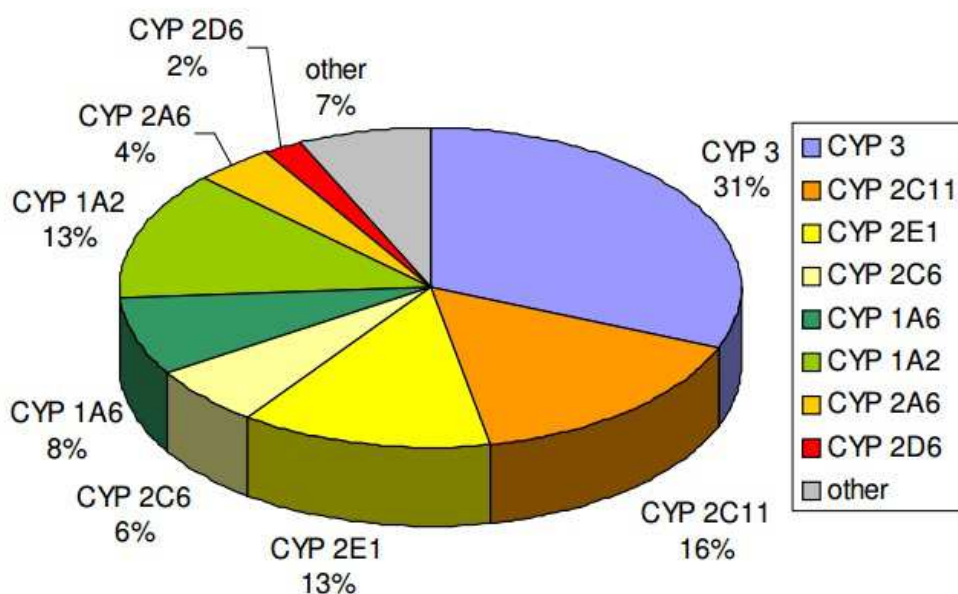
### 1.1.2 Funkce cytochromů P450 v organismu

Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1.) plní v organismu řadu funkcí. Jednak se podílí na důležitých endogenních procesech, jako je například biosyntéza steroidních hormonů, lipofilních vitaminů a přeměna nenasycených mastných kyselin na biologicky aktivní molekuly <sup>[21]</sup>. Podobné úlohy plní i v rostlinách a u hmyzu. U rostlin se podílejí na biosyntéze hormonů a degradaci herbicidů. U hmyzu se účastní kontroly vývoje

prostřednictvím biosyntézy hormonů nebo poskytují rezistenci na insekticidy <sup>[22]</sup>. Jsou však také klíčovými enzymy participujícími na metabolismu exogenních látek (xenobiotik). Hydrofobní sloučeniny, které jsou substráty těchto enzymů, jsou v organismu biotransformovány za vzniku polárnějších produktů. Ty pak mohou být vyloučeny, a tak nedochází k akumulaci příslušných xenobiotik <sup>[6]</sup>. Cytochromy P450 jsou také hlavními enzymy, které se účastní až ze 75 % metabolismu všech dostupných léčiv (Obr. 4) <sup>[23]</sup>. Jedná se hlavně o rodiny CYP1, CYP2 a CYP3, což je patrné z Obr. 5 <sup>[24]</sup>.



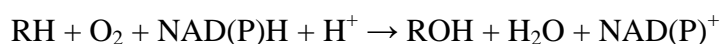
**Obr. 4:** Účast enzymů na metabolismu léčiv. UDP-glukuronosyltransferasa (UGT), flavinové monooxygenasy (FMO), N-acetyltransferasy (NAT), monoaminoxidasy (MAO) <sup>[23]</sup>.



**Obr. 5:** Hlavní izoformy cytochromů P450 podílející se na metabolismu léčiv <sup>[24]</sup>.

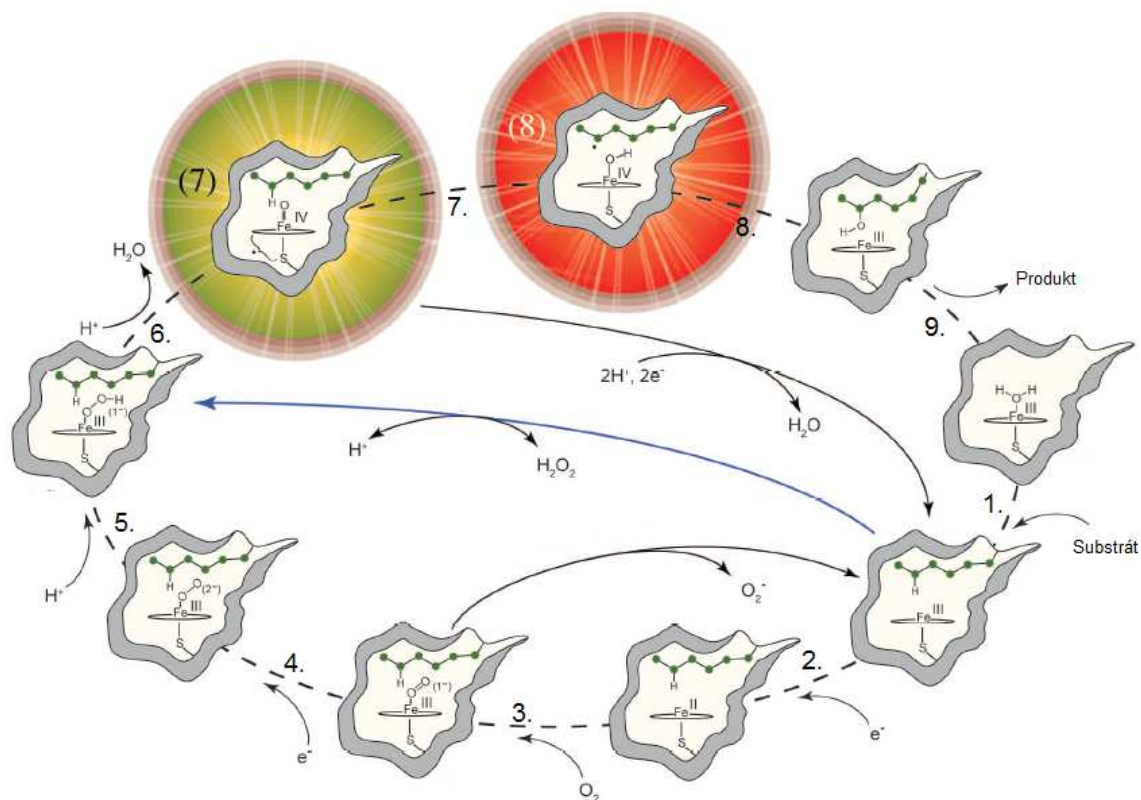
### 1.1.3 Reakční mechanismus cytochromu P450

Cytochromy P450 jsou řazeny mezi monooxygenasy, protože katalyzují reakci, při které dochází ke vstupu jednoho atomu molekulárního kyslíku do substrátu a druhý atom kyslíku se stává součástí molekuly vody. Tuto reakci katalyzovanou systémem cytochromů P450 shrnuje následující rovnice. Podrobnější schéma je uvedeno na Obr. 6 na str. 17<sup>[10]</sup>.



V klidovém stavu je ion železa hemu v tzv. ferri formě (v oxidačním stavu  $\text{III}^+$ ) a je hexakoordinován. Během navázání substrátu do aktivního centra enzymu dochází k vytlačení šestého ligandu, kterým může být kyslík molekuly vody nebo interní aminokyselinový ligand, a ke konformační změně v molekule enzymu (1.). Vazbou substrátu je umožněna jedoelektronová redukce železa cytochromu P450 z  $\text{Fe}^{\text{III}+}$  na  $\text{Fe}^{\text{II}+}$  interakcí s CPR (2.). Tato forma enzymu je pak schopna vazby molekulárního kyslíku ( $\text{O}_2$ ) na redukované železo za vzniku superoxidového komplexu ( $\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}\text{-RH}$ ). Vazba kyslíku může být inhibována v přítomnosti oxidu uhelnatého, který tvoří komplex cytochrom P450-CO-RH (3.). Ve čtvrtém kroku dochází ke druhé redukci elektronem, který může poskytnout buď CPR, nebo cytochrom  $\text{b}_5$ , čímž dojde ke vzniku ferro-superoxidového komplexu (4.). Pokud není druhý elektron doručen dostatečně rychle, komplex se rozpadá a uvolněný superoxidový anionradikál je pak superoxiddismutasou přeměněn na peroxid vodíku, který je pro buňky toxický. Tato druhá redukce je finálním stupněm tzv. aktivační fáze reakčního cyklu cytochromu P450. Vazba mezi kyslíky je dostatečně nestabilní, a tak dochází k jejímu štěpení. Jeden atom kyslíku přijme nejprve jeden proton (5.), poté druhý proton a následně je uvolněn jako molekula vody. Druhý atom kyslíku zůstává vázán na iontu železa v hemu ve formě ferrioxenového komplexu (6.). Vzniklý reaktivní radikál je pak schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylovaného aniontu vázaného na iont železa (7.). Pomocí mesomerního posunu elektronu vznikne forma s navázanými dvěma radikály (OH, substrát) a sítou zpět ve své thiolátové formě (8.). V posledním kroku dochází k rekombinaci radikálů za vzniku nativní formy cytochromu P450 a hydroxyderivátu substrátu (9.)<sup>[22,25,26]</sup>.





**Obr. 6:** Reakční cyklus katalyzovaný cytochromem P450. (7),(8) – reakční intermediáty, u nichž byla nedávno vyřešena jejich struktura <sup>[25]</sup>.

#### 1.1.4 Cytochromy P450 rodiny 1

Rodinu CYP1 tvoří tři funkční geny ve dvou podrodinách. Geny *CYP1A1* a *CYP1A2* se skládají ze sedmi exonů a šesti intronů. Jsou umístěny na chromozomu 15q24.1. Naproti tomu gen pro *CYP1B1* obsahuje pouze tři exony a dva introny a je umístěn na chromozomu 2p22.2 <sup>[27]</sup>.

Cytochromy P450 rodiny 1 mají mezi jednotlivými podrodinami nízkou homologii aminokyselinové sekvence. Lidský CYP1B1 má nízkou sekvenční identitu jak s CYP1A1 (38 %), tak i CYP1A2 (37 %), kdežto CYP1A2 je v 72 % identický v aminokyselinové sekvenci s CYP1A1 <sup>[28]</sup>. Obvykle se vyžaduje, aby v téže rodině měly cytochromy P450 homologii aminokyselinové sekvence vyšší než 40 %. Nicméně do stejné rodiny jsou zařazeny na základě jejich společné indukce přes aryl uhlovodíkový receptor (AhR) a podobné substrátové specifitě. Většina substrátů pro CYP1 jsou planární molekuly složené ze dvou nebo více kondenzovaných aromatických nebo heterocyklických kruhů a dusíku, který se v nich často vyskytuje jako část heterocyklu a/nebo v substituční skupině. Jedná se

zejména o sloučeniny, jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), heterocyklické aromatické aminy (HCA) a estradioly [28].

CYP1A1 a CYP1B1 jsou hlavně extrahepatální enzymy a obecně se v játrech vyskytují v nízkých nebo zanedbatelných koncentracích. CYP1A1 byl dále nalezen v plicích, nadledvinkách, mozku, srdci, ledvinách, vaječnících, placentě, prostatě, kůži, tenkém střevě a ve varlatech. CYP1A2 se nachází zejména v játrech, ale byl také nalezen v nadledvinkách, ledvinách, prostatě a ve varlatech [27].

Bereme-li v úvahu úlohu cytochromů P450 při aktivaci prokarcinogenů (environmentální chemikálie, toxické látky, toxická léčiva), tak CYP1A1 a 1A2 patří mezi nejvýznamnější zástupce. Mohou aktivovat až 90 % všech dosud známých karcinogenů. Podílejí se i na aktivaci genotoxických chemikálií přítomných v cigaretovém kouři. CYP1A2 se účastní také metabolismu steroidů [6].

#### 1.1.4.1 Cytochrom P450 1A1

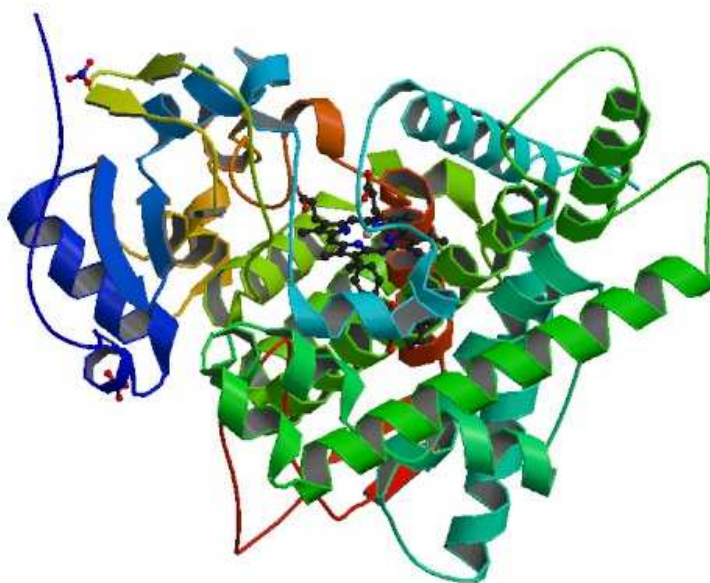
Tento protein se skládá z 512 aminokyselin a nachází se především v extrahepatálních tkáních. CYP1A1 je silně inducibilní enzym, což znamená, že se jeho koncentrace v organismech může za určitých podmínek extrémně navýšit. Jeho množství v jednotlivých tkáních je závislé na mnoha faktorech např. genetickém polymorfismu, vlivu vnějších podmínek (environmentální polutanty chemické nebo fyzikální povahy), výživě, věku, kouření, konzumaci alkoholu, působení podávaných léčiv. Indukován je zejména PAU, jako je benzo[a]pyren (B[a]P) nebo dioxiny, jako je 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Předpokládá se, že rozsah jeho inducibility, zejména pak variabilita způsobená genetickými polymorfismy, které mohou ovlivňovat katalytickou aktivitu enzymů, může souviset s dispozicí vzniku rakoviny plic [6]. Genetický polymorfismus CYP1A1 ovlivňuje výskyt nádorů (počet i růst). Mnohé studie prokázaly, že za zvýšenou pravděpodobnost vzniku rakoviny plic u kuřáků je zodpovědná např. mutace m1 (*MpsI*), při které nedochází k záměně aminokyselin, a m2 (I462Val) [29,30,31].

Specifických inhibitorů CYP1A1 není mnoho. Většina z nich je totiž současně i inhibitorem CYP1B1 a i CYP1A2. Nejpoužívanějším inhibitorem je  $\alpha$ -naftoflavon ( $\alpha$ -NF), který je ale efektivnějším inhibitorem CYP1A2 [32].

Nedávno byla pomocí rentgenostrukturní analýzy zjištěna struktura lidského proteinu CYP1A1 s inhibitorem  $\alpha$ -NF (Obr. 7, str. 19) [33]. Pro krystalizaci nebyl použit wt

CYP1A1, jelikož jeho transmembránová doména krystalizaci znemožňuje, ale modifikovaný protein. cDNA pro lidský CYP1A1 byla zkrácena odstraněním kódující sekvence pro N-terminální transmembránové zbytky aminokyselin 2-34 a nahrazena nukleotidy kódujícími hydrofilní aminokyseliny AKKTSS. Na C-konec před stop kodon byla vložena afinitní značka (6 x his-tag). Tato modifikace umožnila krystalizaci již mnoha membránových cytochromů P450 např. CYP1B1 <sup>[28]</sup>.

Potkaní CYP1A1 je v 80 % identický v aminokyselinové sekvenci s lidským CYP1A1 <sup>[34]</sup>.



**Obr. 7:** Krystalová struktura (2.6 Å) lidského CYP1A1 v komplexu s  $\alpha$ -NF <sup>[33]</sup>.

## 1.2 Heterologní exprese

Heterologní exprese je proces, při kterém je možné exprimovat konkrétní gen nebo část genu, který se přirozeně nevyskytuje v hostitelském organismu, prostřednictvím různých expresních systémů <sup>[35]</sup>. Mezi tyto systémy patří například kvasinky, hmyzí či savčí buňky a bakterie <sup>[36]</sup>. Jedním z nejvíce používaných hostitelských systémů je bakterie *E. coli*, protože rychle roste, její kultivace je levná, je dobře geneticky charakterizovaná a počet dostupných klonovacích vektorů a mutantů se stále zvětšuje <sup>[36,37]</sup>. Srovnání uvedených expresních systémů ukazuje Tab. 2, str. 20.

První savčí CYP exprimovaný v bakteriích *E. coli* byl hovězí cytochrom P450 17 $\alpha$ -hydroxylasa (CYP17A1). K expresi byly použity bakterie *E. coli* kmene JM109. Obecně

platí, že k dosažení dostatečné úrovně exprese v *E. coli* jsou nezbytné modifikace cDNA cytochromu P450. Expresi CYP17A1 umožnily zejména dvě modifikace. Při první došlo k záměně druhé aminokyseliny tryptofan za alanin, protože kodon GCT je nejefektivnější pro expresi genu *LacZ*, který kóduje  $\beta$ -galaktosidasu. Při druhé došlo k úpravě dalších osmi kodonů 5'-konce cDNA zavedením „tichých mutací“ z důvodu zamezení tvorby sekundárních struktur mRNA (Tab. 3) [38].

Pro dosažení vyššího výnosu rekombinantního lidského CYP1A2 byl gen kódující CYP1A2 exprimován v *E. coli* DH5 $\alpha$ F'IQ s vloženým chaperonem Hsp40 či Hsp70. Hsp40 a Hsp70 jsou lidské molekulární chaperony, které pomáhají správně skládat proteiny. Koexpresi CYP1A2 s chaperonem Hsp40 vedla k 3,4x zvýšené expresi aktivního proteinu a v případě Hsp70 k 2,7x zvýšené expresi ve srovnání s výnosem CYP1A2 bez chaperonů [39,40].

**Tab. 2:** Výhody a nevýhody hostitelských systémů pro expresi lidských cytochromů P450 [36].

Faktory	Expresní systém			
	Kvasinky	Savčí buňky	Hmyzí buňky	Bakterie
Čas kultivace do sklizně produktu	dny až týdny	týdny	dny až týdny	hodiny až dny (obvykle 1-2 dny)
Úroveň exprese	střední	nízká až střední	vysoká	vysoká
Technické požadavky pro expresi	nízká	vysoká	střední	vysoká
Finanční nároky	nízká	vysoká	vysoká	nízká
Nutnost přidání ALA	není nutné	není nutné	obvykle nutné	obvykle nutné
Úprava N-konce proteinu	není nutné	není nutné	obvykle nutné	obvykle nutné
Posttranslační modifikace	ano	ano	ano	ne

**Tab. 3:** Nativní a modifikovaná forma cDNA CYP17A1. První modifikace CYP17A1 je vyznačena červeně a ostatní modifikace zeleně [38].

Nativní CYP17A1	ATG	<b>TGG</b>	CTG	CTC	CTG	GCT	GTC	TTT	CTG
	Met	<b>Trp</b>	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Phe	Leu
Modifikovaná CYP17A1	ATG	<b>GCT</b>	CTG	<b>TTA</b>	<b>TTA</b>	<b>GCA</b>	<b>GTT</b>	TTT	CTG
	Met	<b>Ala</b>	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Phe	Leu

### 1.2.1 Heterologní exprese CYP1A1

Tento protein byl v aktivní formě poprvé heterologně exprimován v bakteriích *E. coli* kmene DH5 $\alpha$  pomocí plasmidu pCW. Jelikož při heterologní expresi neupraveného lidského CYP1A1 byl výtěžek velmi malý, došlo k modifikaci daného cytochromu. Sekvence CYP1A1 byla upravena výměnou první aminokyseliny leucin za alanin a úpravou dalších sedmi kodonů 5'-konce cDNA. Exprese upravené formy byla úspěšná, protože poskytla po expresi membránově vázaný protein v množství 25 nmol na litr kultury. Při solubilizaci a purifikaci proteinu byl použit  $\alpha$ -NF z důvodu ochrany proteinu před denaturací detergenty <sup>[41]</sup>.

Dalším pokusem o expresi lidského CYP1A1 byla jeho koexprese s potkaní CPR v bakteriích *E. coli* DH5 $\alpha$  pomocí plasmidu pCW. Do plasmidu pCW byl vložen gen lidského CYP1A1 s jednou modifikací, změnou druhé aminokyseliny, který měl ke svému N-konci připojenou potkaní CPR pomocí spojovacího dipeptidu Ser - Thr. Exprese fúzního proteinu byla poměrně vysoká, protože bylo dosaženo výtěžku 150 nmol na litr kultury. Přечиštěný fúzní protein byl katalyticky aktivní. Katalytická aktivita se po přidání dalšího množství CPR již nezvýšila <sup>[42]</sup>.

Další úspěšná exprese lidského CYP1A1 byla provedena pomocí spojení N-konce enzymu se sekrečním signálem bakteriální alkalické fosfatasy do periplasmatického prostoru bakterie *E. coli*. Tato exprese se u jiných cytochromů P450 nepodařila. Pro expresi byl použit plasmid pLIQ (nesoucí promotor phoA) a buňky DH5 $\alpha$ F'. Tato exprese poskytla protein v množství 4500 nmol na litr kultury. Důvodem podstatně vyšší produkce funkčního CYP může být právě cílení proteinu do periplasmatického prostoru bakterie, kde jsou lokalizovány vhodné enzymy pro inkorporaci hemu do molekuly CYP <sup>[43]</sup>.

Rekombinantní hemoproteiny s nižší afinitou k hemu, jsou často izolovány pouze jako apo-proteiny. Z řady hemoproteinů exprimovaných jako apo-protein v *E. coli*, není možné rekonstruovat holo-protein. Tento problém obvykle řeší přidavek drahého prekursoru hemu, kyseliny  $\delta$ -aminolevulové (ALA), do kultivačního média. Harnastai a spol. vyvinuli nový přístup k posílení syntézy hemu v bakteriální buňce. Sestrojili pomocný plasmid pHg exprimující glutamyl-tRNA reduktasu (*hemA*). To je klíčový enzym podílející se na biosyntéze hemu v *E. coli*. Současná exprese *hemA* a cílového proteinu udržuje rovnováhu mezi syntézou proteinu a syntézou hemu, což vede k tomu, že se nově syntetizovaný rekombinantní apo-protein plynule rekonstituuje s hemem na holo-protein i

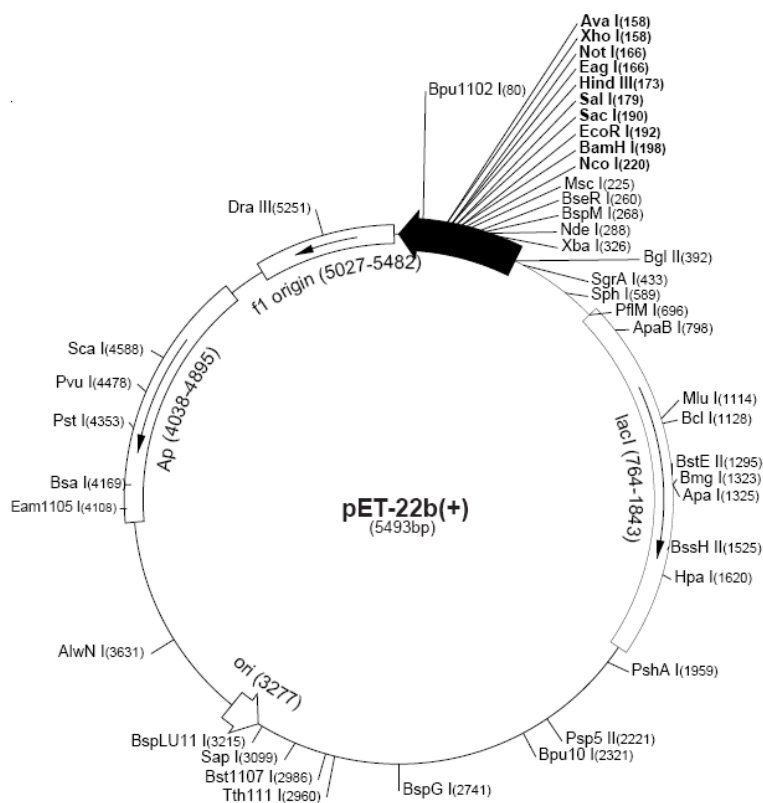
v nepřítomnosti ALA. Expres CYP s vloženým plasmidem pHg je na stejné (CYP1A1) nebo i vyšší úrovni (CYP17) než za přítomnosti ALA <sup>[44]</sup>.

### 1.2.2 Expresní vektory

Jako expresní vektory se nejčastěji používají plasmidy, krátké kruhové fragmenty DNA, které bakterie běžně využívají pro přenos doplňkové genetické informace. Expresní vektor je složen z několika základních sekvencí důležitých pro integraci inzertu, selekci bakteriálního klonu a expresi proteinu jako jsou promotor, terminátor a vazebné místo pro ribozom <sup>[35, 45]</sup>.

#### 1.2.2.1 Plasmid pET- 22b

Plasmid pET je nejpoužívanějším systémem, který byl vyvinut pro klonování a expresi rekombinantních proteinů v *E. coli*. Jeho velikost je 5493 bp. Restrikční mapa plasmidu pET-22b je zobrazena na Obr. 8.



**Obr. 8:** Restrikční mapa expresního vektoru pET-22b <sup>[46]</sup>.

Svůj název získal díky tomu, že využívá T7 expresní systém - „**p**lasmids for **e**xpression by **T**7 RNA polymerase“. Nezbytnou součástí plasmidu pro expresi je T7 RNA

polymerasa, která je pomocí profága DE3 přímo vložena do genomu *E. coli*. Tento vložený fragment obsahuje i promotor *lacUV5*, který kontroluje expresi T7 RNA polymerasy a gen *lacI*, jehož produktem je represor, který se váže na operátorovou sekvenci *lac* promotoru a brání tím syntéze RNA polymerasy<sup>[47]</sup>.

Nejčastěji se k indukci *lac* promotoru používá isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), který je snadno transportován do buněk. Jedná se o analog allolaktosy, metabolitu laktosy, který spouští transkripci *lac* operonu. Na rozdíl od allolaktosy, atom síry přítomný v IPTG vytváří chemickou vazbu, která není buňkou hydrolyzována a brání buňce v jejím metabolismu. Proto zůstává koncentrace IPTG v médiu konstantní. IPTG se váže na *lac* represor a zabraňuje jeho vazbě na operátorovou oblast. V tomto případě dochází k indukci syntézy RNA polymerasy, která specificky přepisuje pouze geny umístěné za T7 promotorem<sup>[48]</sup>.

V plasmidu je zabudován gen pro  $\beta$ -laktamasu, který uděluje transformovaným buňkám rezistenci proti ampicilinu (AMP) a příbuzným antibiotikám, protože hydrolyzuje amidovou vazbu AMP. Ampicilin se přidává do média, v němž jsou buňky kultivovány jako selekční marker.

V sekvenci plasmidu je přítomno polyklonovací místo tzv. „polylinker“, což je úsek obsahující sérii restrikčních míst pro vložení klonovaného genu.

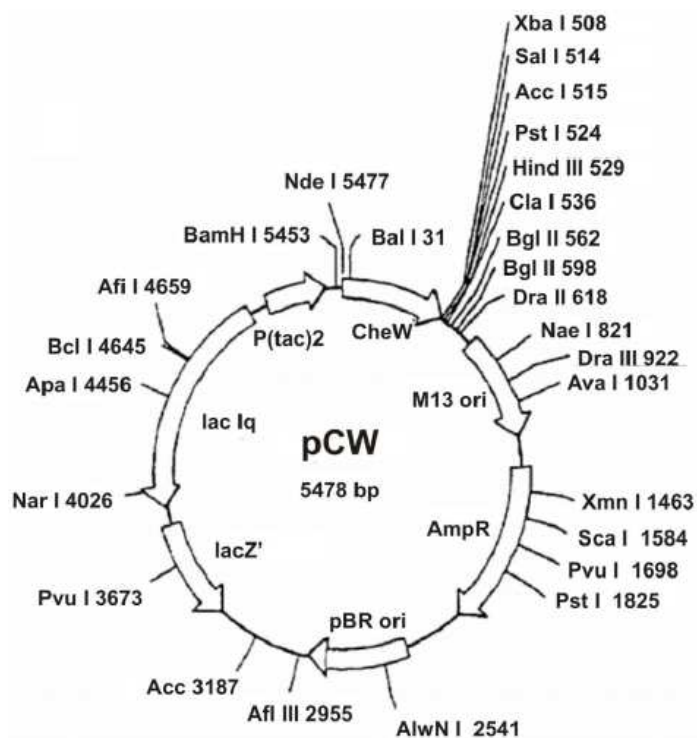
### 1.2.2.2 Plasmid *pCW*

Nejpoužívanějším expresním systémem pro expresi cytochromů P450 v bakteriích *E. coli* je plasmid *pCW*. Jeho velikost je 5478 bp. Mapu toho plasmidu s vyznačenými důležitými segmenty zobrazuje Obr. 9, str. 24.

Plasmid *pCW* vznikl vložení bakteriálního genu *CheW* do plasmidu *pHSE5*. Své jméno dostal od bakteriálního genu *CheW*, který kóduje kontrolní protein bakteriální kinasy *CheA*<sup>[49]</sup>. Za sekvencí genu *CheW* se nachází „polylinker“, který obsahuje mnoho štěpících míst pro restrikční endonukleasy.

Další velmi důležitou součástí plasmidu *pCW* jsou dva *tac* promotory, což jsou hybridní promotory, které vznikly fúzí částí sekvencí promotorů *lacUV5* a *trp*. Tyto promotory jsou pod kontrolou *lac* represoru, který efektivně zabraňuje expresi. Exprese může být aktivována přidáním induktoru, jako je například laktosa nebo IPTG. Tím je represor odstraněn a začne probíhat exprese<sup>[50]</sup>.

V plasmidu je také zabudován gen *AmpR*, který kóduje enzym  $\beta$ -laktamasu, jenž uděluje schopnost přežít v přítomnosti AMP a gen *lacZ'*, který kóduje část enzymu  $\beta$ -galaktosidasu, tzv.  $\alpha$ -fragment (prvních 146 aminokyselin). Pokud je plasmid vnesen do buněk kmene *E. coli*, které exprimují  $\omega$ -fragment  $\beta$ -galaktosidasu (bez prvních 146 aminokyselin), dojde k tzv.  $\alpha$ -komplementaci obou samostatně neaktivních fragmentů za vzniku aktivního proteinu <sup>[51]</sup>.



**Obr. 9:** Mapa expresního vektoru pCW <sup>[52]</sup>.



## 2 Cíl práce

Cílem práce bylo pomocí heterologní exprese připravit a izolovat potkaní cytochrom P450 1A1 potřebný pro provádění metabolických studií, a to v dostatečném množství a čistotě.

Ke splnění tohoto cíle bylo nutné:

- 1) připravit plasmid pro heterologní expresi potkaního cytochromu P450 1A1 a ověřit jeho funkčnost
- 2) optimalizovat podmínky exprese
- 3) purifikovat rekombinantní CYP1A1 pomocí afinitní chromatografie na Ni-NTA nosiči a stanovit jeho aktivitu.

### 3 Materiál a metody

#### 3.1 Použité přístroje

<i>Analytické váhy:</i>	40 SM-200A (Pesa) HM-200 (A&D Instruments LTD)
<i>Aparatura „Western blotting“</i>	Fastblot B43(Biometra)
<i>Aparatura SNAP i.d.</i>	„SNAP i.d. <sup>TM</sup> Protein Detection System“ (Millipore)
<i>Autokláv:</i>	Varioklav 400E (H+P Labortechnik)
<i>Bezdotykový kahan:</i>	Gasprofi2 SCS (VLD-TEC)
<i>Centrifugy:</i>	5415 D/R (Eppendorf) Janetzki K70D (MLW) Allegro X-22R (Beckman Coulter; rotory 4250 a 630) Z 383K (HERMLE) Stolní minicentrifuga (Labnet) Stolní minicentrifuga Gilson (GmC Lab)
<i>DNA Speed Vac:</i>	DNA 110 (Savant)
<i>Elektroforetická aparatura:</i>	MSMINI 10-Multi Sub Mini, Uvitec miniVE Vertical, Amersham Biosciences
<i>Fotoaparát:</i>	DMC-LS65 (Panasonic)
<i>Homogenizátor:</i>	Dle Pottera a Elvehjema
<i>Inkubátor:</i>	IR 1500 Automatic CO2 Incubator (Flow Laboratories)
<i>Laminární box:</i>	BIO 126 (Labox)

<i>Ohřívač bloků:</i>	LS1 (VLM GmbH)
<i>Peristaltická pumpa:</i>	PP-05 (Laboratorní přístroje Praha)
<i>Předvážky:</i>	EW600-2M (Kern) 440-35-N (Kern) EK-600H (A&D Instruments LTD)
<i>Ultracentrifuga:</i>	Optima™ LE-80K (Beckman Coulter; rotor Ti 70 a Ti 45)
<i>Spektrofotometry:</i>	Spekol 11 (Carl Zeiss Jena) Spekord M40 (Carl Zeiss Jena) NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare)
<i>Sonikátor:</i>	Elmasonic E 30 H (P-LAB) Sonopuls HD 3100 (Bandelin)
<i>Termocykler:</i>	Tech gene (TECHNE)
<i>Transiluminátor:</i>	Dark Reader (Clare Chemical Research)
<i>Třepačka:</i>	ORBI-SAFE TS Net Wise (Gallenkamp) G24 Environmental Incubator Shaker (New Brunswick Scient Edison, N.J. USA) Mini Rocker MR-1 (BioSan) Yellow line OS 2 basic (IKA-Werke GmbH & Co.KG)
<i>Vodní lázně:</i>	Julabo TW2, Biotech TE-10D Tempunit (TECHNE)
<i>Zdroj pro elektroforézu:</i>	Electrophoresis Power Supply 301 (Amersham Pharmacia Biotech)

## 3.2 Použitý materiál a chemikálie

Materiál a chemikálie v provedených experimentech pocházejí z těchto firem:

<b>Abcam (Velká Británie)</b>	primární králičí polyklonální protilátka proti CYP1A1
<b>AppliChem (Německo)</b>	$\delta$ -aminolevulová kyselina (ALA)
<b>Affymetrix (Kanada)</b>	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamonio]-1-propan-sulfonát (CHAPS)
<b>Duchefa Biochemie<sup>b</sup><sub>v</sub></b>	chloramfenikol
<b>East Port (ČR)</b>	oligonukleotidy, deoxynukleosidtrifosfáty
<b>Erba Lachema (ČR)</b>	bromfenolová modř, octan sodný, dithioničitan sodný, EDTANa <sub>2</sub> (chelaton 3), hydroxid draselný, chlorid draselný, kyselina chlorovodíková, citrát železitý, chlorid zinečnatý, chlorid kobaltnatý hexahydrát, molybdenan sodný dihydrát, chlorid vápenatý, chlorid měďnatý dihydrát, kyselina boritá, dihydrogen fosforečnan draselný, hydroxid sodný, ethanol
<b>Fermentas (Kanada)</b>	<i>Pfu</i> DNA polymerasa (+ pufr + 25mM MgSO <sub>4</sub> ) [2,5 U/□l], 25mM MgSO <sub>4</sub> , 2-Log DNA marker, $\lambda$ DNA/EcoRI + HindIII marker, marker na SDS elektroforézu „PageRuler™ Broad Range“
<b>Fluka (Švýcarsko)</b>	akrylamid, N,N-methylen-bis-akrylamid (BIS), dodecylsulfát sodný (SDS), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Base), 2-merkapt ethanol, lysozym z vaječného bílku, 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-fosfocholin (DLPC)

**Gentest Comporation (USA)**

Supersomální potkaní CYP1A1 rekonstituovaná s reduktasou

**Genomed (Německo)**

JET quick-Plasmid Miniprep Spin Kit

JET quick-Gel Extraction Spin Kit

**Invitrogen (USA)**

SYBR Safe<sup>TM</sup> DNA Gel Stain

**Karlan®(USA)**

E-911 [2 - (4-nonyl fenoxo) ethanol]

**Lach-Ner (ČR)**

kyselina octová (HAc), glycerol, kyselina chlorvodíková, dihydrogen fosforečnan draselný (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), chlorid draselný

**Linde (ČR)**

dusík (g), oxid uhelnatý (g)

**Millipore (USA)**

Immobilon<sup>TM</sup> PVDF (polyvinylidenfluorid) membrány,  
Amicon® Ultra centrifugační zkumavky

**NEW ENGLAND BioLabs (Velká Británie)**

T4 DNA Ligasa (+ pufr) [400 000 U/ml], NdeI (20 000 U/ml), XhoI (20 000 U/ml), HindIII (20 000 U/ml), BamHI (100 000 U/ml), NEB2 pufr, NEB4 pufr, BSA (100 mg/ml)

**Penta (ČR)**

methanol, glycin

**Qiagen (Německo)**

Ni-NTA agarosa

**SERVA Electrophoresis (Německo)**

Coomassie Brilliant Blue R-250, ampicilin (sodná sůl), isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid (IPTG); N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), triton X-100, kvasničný extrakt, bakteriologický pepton, trypton, leupeptin, aprotinin, bestatin, tris (base) [tris(hydroxymethyl)aminomethan]

<b>Sevapharma (ČR)</b>	hovězí sérový albumin (BSA)
<b>Sigma-Aldrich (USA)</b>	Luria Broth (LB), Luria Agar, dimethylsulfoxid (DMSO), sacharosa, $\alpha$ -naftoflavin, dithiothreitol (DTT), imidazol; 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchoninová kyselina (BCA), fenylmethanolsulfonyl fluorid (PMSF), persíran amonný, kozí sekundární protilátka proti králičí polyklonální protilátce značená alkalickou fosfátasou, L-arabinoxylan, nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (NADPH), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES), resorufin, 7-ethoxyresorufin (ER), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT), 2-morfolinoethansulfonová kyselina (MES)
<b>Top-Bio (ČR)</b>	PCR agarosa, DNA marker (155-970 pb)
<b>Whatman (USA)</b>	chromatografický papír č. 3

### 3.3 Použité plasmidy, bakteriální buňky a reduktasa

<b><i>E. coli</i> DH5a</b>	- poskytl Mgr. Daniel Rozbeský
<b><i>E. coli</i> BL-21GOLD(DE3)</b>	- Agilent technologies
<b>pET/1A1wt_histag</b>	- v rámci své diplomové práce na katedře biochemie PřF UK vytvořil Mgr. Martin Dvořák <sup>[53]</sup>
<b>pCW_MCS</b>	- vytvořil a poskytl Mgr. Jan Milichovský
<b>pCW/1A1mod</b>	- poskytl Prof. Strobel (Houston, Texas, USA)
<b>pGro7</b>	- od firmy Takara (Clontech)
<b>pHg1</b>	- poskytl Prof. Usanov (Minsk, Bělorusko)
<b>NADPH:CYP reduktasa</b>	- v rámci své diplomové práce na katedře biochemie PřF UK purifikoval Mgr. Martin Stráňava <sup>[54]</sup>

### 3.4 Použité metody

Veškerý spotřební materiál použitý pro práci s bakteriemi a DNA (zkumavky Falcon, mikrozkušavky Eppendorf, Erlenmeyerovy baňky, špičky, MQ voda, připravené pufry, média atd.) byl sterilizován autoklárováním (Varioklav 400E, H+P Labortechnik) po dobu 20 minut při teplotě 121°C.

#### 3.4.1 Příprava agarových ploten s antibiotikem

##### Použité roztoky:

- **LB agar:** 4g Luria agaru ve 100 ml destilované vody

Zásobní roztok sterilního agaru byl rozehrát v pootevřené lahvi v mikrovlnné troubě. Potřebné množství agaru bylo odlito do sterilní zkumavky Falcon (50 ml). Do agaru zchladlého na teplotu cca 60°C byl v případě buněk *E. coli* kmene BL-21GOLD(DE3) nebo DH5α přidán ampicilin do výsledné koncentrace 100 µg/ml. V případě buněk *E. coli* DH5α s vnesenými plasmidy pGRO7 nebo pHg1 byl navíc kromě ampicilinu přidán chloramfenikol do výsledné koncentrace 20 µg/ml. Směs byla řádně promíchána a následně přelita vždy po cca 10 ml do Petriho misek. Misky byly při laboratorní teplotě ponechány ve vodorovné poloze až do ztuhnutí agaru.

#### 3.4.2 Transformace bakterií *Escherichia coli* tepelným šokem

##### Použité roztoky:

- **LB médium:** 25g Luria Broth v 1 l destilované vody

Alikvoty kompetentních buněk uchovávané při - 80°C byly ponechány roztát po dobu cca 10 minut na ledu. Do nové mikrozkušavky Eppendorf bylo odebráno 100 µl buněk z alikvoty *E. coli* o objemu 200 µl a přidáno 1-3 µl plasmidu (popřípadě 20 µl ligační směsi). Do zbytku buněk *E. coli* byla pipetována sterilní MQ voda pro vytvoření kontroly. Připravené směsi byly jemně promíchány a ponechány na ledu po dobu 30 minut. Poté byly podrobeny tepelnému šoku v předeřháté vodní lázni (Julabo TW2) nebo v předeřhátém ohřívači bloků LS1 (VLM GmbH) na teplotu 42°C. Buňky *E. coli* BL-21GOLD(DE3) byly podrobeny tepelnému šoku po dobu 45 sekund a v případě buněk

*E. coli* DH5 $\alpha$  to bylo 90 sekund. Po vyjmutí byly vzorky okamžitě vloženy do ledové lázně na 2-3 minuty. Po rychlém ochlazení bylo do vzorků přidáno 300  $\mu$ l LB média bez ampicilinu (cca trojnásobek objemu buněk). Takto připravené vzorky byly inkubovány při 37°C po dobu 1 hodiny (inkubátor IR 1500), následně byly naneseny na připravené agarové plotny s antibiotiky a rozetřeny sterilní mikrobiologickou hokejkou. Plotny byly inkubovány přes noc při 37°C.

### 3.4.3 Přeočkování bakteriálních buněk metodou „single-cell“

#### Použité roztoky:

- **LB médium:** 25 g Luria Broth v 1 l destilované vody

Přes noc na připravených plotnách narostly kolonie transformovaných buněk. Kolonie pravidelného vzhledu a dostatečně vzdálené od ostatních kolonií byly vybrány a sterilně přeočkovány do 50ml zkumavky Falcon s 5-10 ml LB média nebo do 500ml Erlenmayerových baněk se 100 ml LB média. V případě buněk *E. coli* BL-21GOLD(DE3) a DH5 $\alpha$  byl do LB média přidán ampicilin do výsledné koncentrace 100  $\mu$ g/ml. V případě buněk DH5 $\alpha$  s vnesenými plasmidy pGRO7 a pHg1 byl přidán do LB média navíc chloramfenikol do výsledné koncentrace 20  $\mu$ g/ml.

Přeočkování probíhalo v laminárním boxu (BIO 126). Vybraná kolonie byla pomocí opálené pinzety a sterilního párátko setřena a celé párátko i s vybranou kolonií bylo vloženo do připravené zkumavky Falcon nebo Erlenmayerovy baňky.

Zkumavka s povoleným víčkem nebo Erlenmayerova baňka se zátkou z buničiny byla inkubována v třepačce (G24 Environmental Incubator Shaker, New Brunswick Scient Edison) přes noc při 37°C a 220 RPM. Agarové plotny byly utěsněny parafilmem a uloženy do lednice pro případné další použití.

### 3.4.4 Kultivace buněk *E.coli* v bakteriálních růstových médiích

#### Použité roztoky:

- **LB médium:** 25 g Luria Broth v 1 l destilované vody
- **modifikované TB médium:** roztok A i roztok B byly autoklávovány 20 min při 121°C odděleně a spojeny bezprostředně před použitím



- a) roztok A: 12 g tryptonu; 24 g kvasničného extraktu; 2 g bakteriologického peptonu; 8 ml 50% glycerolu → doplněno destilovanou vodou na 900 ml
- b) roztok B: 2,31 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 12,54 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  → doplněno destilovanou vodou na 100 ml
- **roztok kovů** (4 000x koncentrovaný roztok): 2,45 g  $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7$  (citrát železitý); 10 ml koncentrované HCl; 0,131 g  $\text{ZnCl}_2$ ; 0,2 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,075 g  $\text{CaCl}_2$ ; 0,127 g  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,05 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  → doplněno sterilní vodou do 100 ml

#### 3.4.4.1 Kultivace buněk *E.coli* v malém objemu bakteriálních růstových médií

Během experimentů byly použity různé typy médií, různé vektory a různé látky pro indukci. Tyto experimenty byly prováděny z důvodu zjištění nejúčinnějších podmínek exprese proteinu. Konkrétní kultivace jsou popsány v kapitole výsledky. Popsaná metoda ukazuje obecný postup kultivace buněk v malém objemu bakteriálních růstových médií.

Do sterilních 100 ml Erlenmeyerových baněk bylo odměřeno 25 ml bakteriálního růstového média, a to LB média nebo modifikovaného TB média. Do modifikovaného TB média bylo dále přidáno 6,25  $\mu\text{l}$  roztoku kovů (4 000x koncentrovaný) a thiamin do koncentrace 1mM. V případě buněk *E. coli* BL-21GOLD(DE3) či DH5 $\alpha$  bylo médium doplněno o ampicilin (výsledná koncentrace 100  $\mu\text{g/ml}$ ). V případě buněk *E. coli* DH5 $\alpha$  s plasmidy pGRO7 a pHg1 byl ještě navíc přidán chloramfenikol do koncentrace 20  $\mu\text{g/ml}$ . Média byla inokulována 250  $\mu\text{l}$  buněk z kultury získané přeočkováním metodou „single-cell“ (viz kapitola 3.4.3, str. 32). Baňky byly inkubovány při 37°C a 220 RPM (ORBI-SAFE TS Net Wise). Během kultivace buněk byla průběžně měřena optická densita při vlnové délce 600 nm (Spekol 11, Carl Zeiss Jena). Při optické densitě cca 0,5 byla snížena teplota inkubace na 30°C pro buňky transformované plasmidem pCW a na 22°C pro plasmid pET. Po nárůstu buněk do optické denzity cca 0,6 - 0,8 byly sníženy otáčky na 150 RPM a byla indukována exprese proteinu přidáním 1M IPTG do výsledné koncentrace 0,5 - 1mM. Před přidáním IPTG byla ve všech případech kromě buněk DH5 $\alpha$  s vneseným plasmidem pHg1 ještě přidána ALA do výsledné koncentrace 0,5 - 1mM a při použití buněk DH5 $\alpha$  s vneseným plasmidem pGRO7 byla vždy ještě přidána L-arabinsa do výsledné koncentrace 1 mg/ml. Kultivace buněk byla ukončena po 24 nebo po 48 hodinách

od indukce. V 1 ml narostlé kultury byla zjištěna koncentrace cytochromu P450 (viz kapitola 3.4.19, str. 50).

#### 3.4.4.2 Kultivace buněk *E.coli* ve velkém objemu bakteriálních růstových médií

Pro potřeby produkce proteinu pro purifikaci byla provedena kultivace buněk *E.coli* DH5α ve velkém objemu bakteriálních růstových médií. V tomto případě byly inokulovány 2 l Erlenmeyerovy baňky obsahující 500 ml modifikovaného TB média 5 ml buněk z kultury získané přeočkováním metodou „single-cell“ (viz kapitola 3.4.3, str. 32). Další postup je shodný s postupem popsaným v kapitole 3.4.4.1, str. 33. Kultivace buněk probíhala při 37°C a 220 RPM (ORBI-SAFE TS Net Wise). Při dosažení optické denzity cca 0,5 byla snížena teplota na 30°C. Expres proteinu byla indukována při optické denzitě 0,6 - 0,8 přidáním IPTG do 0,5mM koncentrace. Zároveň byla přidána i ALA rovněž do výsledné koncentrace 0,5mM a sníženy otáčky na 150 RPM. Produkce byla ukončena po 48 hodinách.

### 3.4.5 Polymerasová řetězová reakce

#### Použité roztoky:

- **Pfu pufr s MgSO<sub>4</sub> (10x koncentrovaný):** 200mM Tris-HCl; 100mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 100mM KCl; 1 mg/ml BSA; 1% (v/v) Triton X-100; 20mM MgSO<sub>4</sub> → pH 8,8

Polymerasová řetězová reakce (PCR) slouží k namnožení požadovaného úseku DNA pomocí specifických párů primerů (oligonukleotidů). PCR byla použita nejen pro namnožení požadovaného úseku DNA, ale i pro úpravu genu obsaženého v plasmidu pCW/1A1mod. Na C-konec tohoto genu byla nově vložena afinitní značka (6 x his-tag) a štěpící místo pro restriční endonukleasu XhoI. Tento gen je dále nazýván *1A1mod\_histag*. Pro úpravu genu *1A1mod* obsaženého v plasmidu pCW/1A1mod byly navrženy primery uvedené v Tab. 4.

**Tab. 4:** Primery pro úpravu genu *1A1mod* obsaženého v plasmidu pCW/1A1mod.

Název primerů	Sekvence
<b>Rat1A1 - rev</b>	5'- TATCTAAGCTTTCATTAATGATGATGATGATGCTCGAGGCCTGGAGATGCTG -3'
<b>pCW - forw</b>	5'- GTTTTGCACCATTCGATG - 3'

Lyofilizované primery Rat1A1 - rev a pCW - forw byly rozpuštěny ve sterilní vodě na výslednou koncentraci 100  $\mu\text{M}$ . Část vzorku byla dále naředěna na výslednou koncentraci 20  $\mu\text{M}$ . Jako templát byl použit plasmid pCW/1A1mod, který byl desetkrát naředěn sterilní vodou. Následně byla připravena reakční směs pro PCR, která obsahovala:

- 1  $\mu\text{l}$  templátu (cca 250 ng)
- 1  $\mu\text{l}$  „reverse“ primeru (Rat1A1 - rev)
- 1  $\mu\text{l}$  „forward“ primeru (pCW - forw)
- 1  $\mu\text{l}$  směsi dNTP (10mM)
- 5  $\mu\text{l}$  Pfu pufru s  $\text{MgSO}_4$  (10x koncentrovaný)
- 6  $\mu\text{l}$   $\text{MgSO}_4$  (25mM)
- 2  $\mu\text{l}$  DMSO
- 1  $\mu\text{l}$  Pfu polymerasy
- sterilní voda (do celkového objemu 50  $\mu\text{l}$ )

Reakce probíhala v termocykleru (Tech gene, TECHNE) nastaveném na tyto podmínky:

### 30 cyklů

- 94°C po dobu 30 s → rozvolnění DNA
- 53°C po dobu 30 s → nasednutí primerů
- 73°C po dobu 2 min → polymerace

### 1 cyklus

- 73°C po dobu 8 min → polymerasa dokončí syntézu segmentu DNA
- 6°C do doby odebrání vzorků z termocykleru

### 3.4.6 Srážení produktu PCR isopropanolem

Produkt PCR byl srážen isopropanolem z důvodu odstranění některých komponent reakční směsi a převedení produktu do menšího objemu roztoku pro štěpení pomocí endonukleas.

Směs po PCR (50  $\mu\text{l}$ ) byla smíchána s 250  $\mu\text{l}$  sterilní vody. Vzniklý roztok byl doplněn stejným objemem vychlazeného isopropanolu a centrifugován při 4°C (5415D/R,

Eppendorf) po dobu 30 minut při 16 100g. Po uplynutí této doby byl isopropanol pomocí vývěvy opatrně odstraněn tak, aby nedošlo k odsátí usazené pelety. Následně byla peleta promyta vychlazeným 75% ethanolem a znovu centrifugována po dobu 5 minut při 16 100g. Ethanol byl také opatrně odsán stejným způsobem jako u isopropanolu. Usazená peleta byla vysušena při laboratorní teplotě a následně uchována v -20°C.

### 3.4.7 Dvojité štěpení pomocí endonukleas BamHI a HindIII

#### Použité roztoky:

- pufr NEB 2 (1x koncentrovaný): 50mM NaCl; 10mM Tris-HCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM DTT → pH 7,9

Za účelem ligace insertu 1A1mod\_histag, získaného pomocí PCR a metody srážení produktu PCR isopropanolem (viz kapitola 3.4.5 na str. 34 a 3.4.6 na str. 35), do plasmidu pCW (pCW/1A1mod), která vedla k přípravě expresního konstruktu (pCW/1A1mod\_histag), bylo nutné provést dvojí štěpení jak insertu, tak plasmidu prostřednictvím endonukleas BamHI a HindIII. Endonukleasa HindIII je enzym pocházející z *Haemophilus influenzae*. Endonukleasa BamHI je enzym pocházející z *Bacillus amyloliquefaciens* H a potřebuje pro úspěšné štěpení dodání BSA. Podmínky, za kterých jsou obě endonukleasy zároveň aktivní, byly nalezeny na webových stránkách firmy New England Biolabs v aplikaci „Double Digest Finder“<sup>[55]</sup>.

Ke štěpení byla použita tato reakční směs:

- a) Štěpení 1A1mod\_histag:
  - 25 µl produktu PCR 1A1mod\_histag (dle koncentrace)
  - 3 µl pufru NEB 2 (10x koncentrovaný)
  - 1 µl endonukleasy HindIII
  - 0,3 µl endonukleasy BamHI
  - 0,3 µl BSA (10 mg/ml)
  - reakční směs byla doplněna sterilní vodou na celkový objem 30 µl
- b) Štěpení plasmidu pCW/1A1mod:
  - 10 µl plasmidu pCW/1A1mod (dle koncentrace)

- 2 µl pufru NEB 2 (10x koncentrovaný)
- 1 µl endonukleasy HindIII
- 0,3 µl endonukleasy BamHI
- 0,2 µl BSA (10 mg/ml)
- reakční směs byla doplněna sterilní vodou na celkový objem 20 µl

Jednotlivé složky reakční směsi byly inkubovány po dobu 2 hodin při teplotě 37°C.

### 3.4.8 Dvojité štěpení pomocí endonukleas NdeI a XhoI

#### **Použité roztoky:**

- **pufr NEB 4 (1x koncentrovaný):** 50mM octan draselný; 20mM Tris-acetát; 10mM octan hořečnatý; 1mM DTT → pH 7,9

Za účelem ligace insertu 1A1wt\_histag získaného z plasmidu pET22b/1A1wt\_histag do plasmidu pCW, která vedla k přípravě expresního konstruktu (pCW/1A1wt\_histag) bylo nutné provést dvojitě štěpení jak plasmidu pET22b/1A1wt\_histag, tak plasmidu pCW/1A1mod prostřednictvím endonukleas NdeI a XhoI. Endonukleasa NdeI je enzym pocházející z *Neisseria denitrificans*. XhoI je enzym pocházející z *Xanthomonas holcicola*. Podmínky, za kterých jsou obě endonukleasy zároveň aktivní, byly nalezeny na webových stránkách firmy New England Biolabs v aplikaci „Double Digest Finder“<sup>[55]</sup>. Endonukleasa XhoI potřebuje pro úspěšné štěpení dodání BSA.

Ke štěpení byly použity tyto reakční směsi:

- a) Štěpení plasmidu pET22b/1A1wt\_histag:
  - 2 - 5 µl plasmidu pET22b/1A1wt\_histag (dle koncentrace)
  - 0,2 µl BSA (10 mg/ml)
  - 2 µl pufru NEB 4 (10x koncentrovaný)
  - 1 µl endonukleasy NdeI
  - 1 µl endonukleasy XhoI
  - reakční směs byla doplněna sterilní vodou na celkový objem 20 µl

b) Štěpení plasmidu pCW/1A1mod:

- 10 µl plasmidu pCW/1A1mod (dle koncentrace)
- 0,2 µl BSA (10 mg/ml)
- 2 µl pufru NEB 4 (10x koncentrovaný)
- 1 µl endonukleasy NdeI
- 1 µl endonukleasy XhoI
- reakční směs byla doplněna sterilní vodou na celkový objem 20 µl

Jednotlivé složky reakční směsi byly inkubovány po dobu 2 hodin při teplotě 37°C.

### 3.4.9 Horizontální agarosová elektroforéza

#### Použité roztoky:

- **TAE pufr** (zásobní roztok 50x koncentrovaný): 2M Tris; 1M kyselina octová; 50mM EDTA → pH 8,2
- **vzorkový pufr** (5x koncentrovaný): 40% sacharosa (w/v); 0,1% bromfenolová modř (w/v)

Horizontální agarosová elektroforéza byla využita pro kontrolu a přečištění vzorků po provedení dvojitého štěpení DNA.

Pro tuto metodu byl použit 1% (w/v) gel, který byl připraven smícháním 0,4 g agarosy a 40 ml 1x koncentrovaného TAE pufru. Roztok byl zvážen a následně zahříván v mikrovlnné troubě až do rozpuštění agarosy. Během zahřívání došlo k odpaření části vody, proto byl roztok doplněn destilovanou vodou na původní hmotnost. Do vlažného gelu (cca 60°C) byly přidány 2 µl barviva SYBR Safe<sup>TM</sup> DNA gel Stain (20 000x koncentrovaného). Vše bylo řádně promícháno a nalito do vaničky pro elektroforézu. Bezprostředně po nalití byl do vaničky vložen elektroforetický hřeben, který vytvaroval potřebné jamky pro nanesení vzorků. Po ztuhnutí gelu byl elektroforetický hřeben vyndán. Vanička byla umístěna do elektroforetické aparatury (MSMINI 10-Multi Sub Mini), která byla naplněna elektrodovým 1x koncentrovaným TAE pufrem.

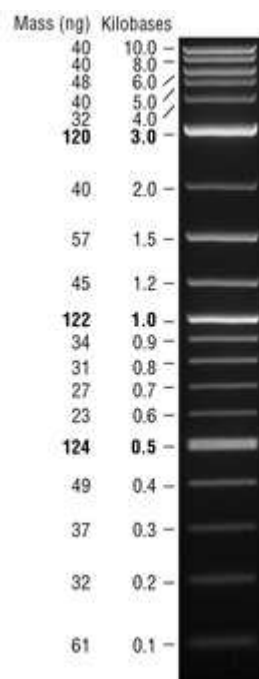
Do jedné z vytvořených jamek bylo pipetováno 6 µl roztoku markeru 2-log DNA Ladder. Do zbývajících jamek byly aplikovány vzorky se vzorkovým pufrem v

maximálním objemu 25  $\mu$ l. Elektroforéza probíhala po dobu 30-40 minut pod napětím 110 V (Electrophoresis Power Supply 301, Amerham Pharmacia Biotech).

Po dokončení elektroforézy byl gel umístěn na transluminátor (Dark Reader, Clare Chemical Research) a v temné místnosti bylo pozorováno elektroforetické rozdělení molekul DNA.

### 3.4.10 Určení koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace DNA pro ligaci byla odhadována z agarosového gelu podle jednotlivých složek markeru 2-Log DNA Ladder po horizontální agarosové elektroforéze. Na Obr. 10 je zobrazen marker 2-Log DNA Ladder na 1% agarosovém gelu s vyznačenými hodnotami velikostí a hmotností jednotlivých složek <sup>[56]</sup>.



**Obr. 10:** Marker 2-Log DNA Ladder <sup>[56]</sup>.

Pro přesnější měření koncentrace a čistoty DNA bylo využito spektrofotometru NanoVue Plus. Ten byl nastaven na délku optické dráhy 0,5 mm a na přepočítávací faktor 50 (faktor pro dvouvláknovou DNA). Na zlatou hydrofobní destičku spektrofotometru byly nejprve pipetovány 3  $\mu$ l MQ vody jako slepý vzorek, poté následovalo měření s 3  $\mu$ l vzorků. Byly získány hodnoty koncentrace, hodnoty absorbance při 230, 260, 280 a 320 nm, včetně poměrů absorbancí potřebných k zjištění čistoty DNA.

### 3.4.11 Izolace DNA z agarosového gelu pomocí kitu „JET quick - Gel Extraction Spin Kit“

#### Použité roztoky:

- **TE pufr:** 10mM Tris-HCl; 1mM EDTA → pH 8,0

Z agarosového gelu byly vyřezány sterilním skalpelem potřebné fragmenty DNA, pokud možno bez kontaminace ostatními fragmenty. Tyto části gelu byly dány do předem zvážených mikrozkušavek Eppendorf a hmotnost gelu byla zjištěna na analytických vahách. Dále byla prováděna izolace DNA pomocí komerčního kitu JET quick – Gel Extraction Spin Kit podle přiloženého návodu.

Do každé mikrozkušavky Eppendorf bylo dodáno vypočtené množství solubilizačního roztoku L1 obsahujícího perchlorát sodný, acetát sodný a TBE-solubilizátor tak, aby 1 mg gelu odpovídaly 3  $\mu$ l roztoku. Připravené mikrozkušavky byly vloženy do ohřívače bloků LS1 (VLM GmbH) předehřátého na teplotu 50°C na dobu 15 minut. Během této doby byly mikrozkušavky vždy po třech minutách z ohřívače bloků vyndány, promíchány pomocí vortexu a vráceny zpět. Po rozpuštění gelu byl roztok pipetován na JETquick kolonku. Maximální objem, který může být aplikován na jednu kolonku je 600  $\mu$ l. Kolonky byly vloženy do 1,5ml sběracích mikrozkušavek a centrifugovány (centrifuga 5415D/R, Eppendorf) po dobu 1 minuty při 12 400g. Eluovaný roztok byl odstraněn. Kolonky byly promyty 500  $\mu$ l roztoku L2 (obsahuje Tris-HCl; NaCl; EDTA; ethanol → pH 7,5). Opět byla provedena centrifugace při 12 400g po dobu 1 minuty. Eluovaný roztok byl odstraněn. Pro odstranění zbytků pufru L2 byly vzorky podrobeny další centrifugaci při 16 000g po dobu 1 minuty. Sběrací mikrozkušavky byly vyměněny za nové, sterilní. Doprostřed kolonky bylo pipetováno 40  $\mu$ l sterilního TE pufru, který byl vytemperován na teplotu 60°C. Po 1 minutě byla provedena poslední centrifugace při 12 400g po dobu 2 minut. Eluovaná DNA byla uchována při teplotě - 20°C.

### 3.4.12 Ligace

#### Použité roztoky:

- **pufr pro T4 DNA ligasu (10x koncentrovaný):** 50mM Tris-HCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM ATP; 10mM DTT → pH 7,5



Z důvodu vložení insertů do plasmidu pCW byla provedena ligace. Pokaždé byla použita DNA ligasa z bakteriofága T4.

Ligační směs o celkovém objemu 20 µl obsahovala:

- 2 µl pufru pro T4 DNA ligasu (10x koncentrovaný)
- 1 µl DNA ligasy
- 8 µl štěpeného plasmidu (dle koncentrace)
- 9 µl štěpeného insertu (dle koncentrace)

Nejprve byl v mikrozkuhavce smíchán insert s plasmidem. Připravená mikrozkuhavka byla vložena na 5 minut do termocykleru (Tech gene, TECHNE) na 45°C, aby ve směsi došlo k rozrušení nežádoucích interakcí mezi komplementárními konci DNA. Následně byla směs ochlazená v ledničce po dobu 2 minut. Nakonec byl do mikrozkuhavky přidán pufr pro T4 DNA ligasu a DNA ligasa. Ligace byla prováděna při 16°C v termocykleru přes noc.

### 3.4.13 Minipreparace plasmidové DNA

#### Použité roztoky:

- **STE pufr:** 10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; 100mM NaCl → pH 8,0
- **GTE pufr:** 25mM Tris-HCl; 10mM EDTA; 50mM glukosa → pH 8,0
- **lyzační roztok (1 ml):** 40 µl 5M NaOH; 100 µl 10% SDS → doplněno destilovanou vodou na 1 ml
- **roztok K-AC (25 ml):** 15 ml 5M octan draselný; 3 ml ledová kyselina octová; voda do 25 ml → pH 5,4
- **TE pufr:** 10mM Tris-HCl; 1mM EDTA → pH 8,0
- **fenol:chloroform:isoamylalkohol:** v poměru 25 : 24 : 1

Tato metoda je rychlá a poskytuje DNA, která je vhodná k transformaci a štěpení, ale není dostatečně čistá pro sekvenaci.

Nejprve bylo provedeno přeočkování bakteriálních buněk metodou „single-cell“ (viz kapitola 3.4.3, str. 32). Následující den bylo odebráno 1,5 ml narostlé kultury. Buňky byly centrifugovány (centrifuga 5415D/R, Eppendorf) po dobu 30 sekund, při 15 000g. Vzniklý

supernatant byl odlit. Peleta byla resuspendována ve 400  $\mu$ l STE pufru, přenesena do 1,5 ml zkumavky Eppendorf a centrifugována po dobu 30 sekund, při 15 000g. Supernatant byl co nejdůkladněji odstraněn a peleta byla resuspendována ve 100  $\mu$ l GTE pufru. Okamžitě po resuspendování bylo přidáno 200  $\mu$ l čerstvě připraveného lyzačního roztoku. Zkumavka Eppendorf byla několikrát převrácena a inkubována po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 150  $\mu$ l ledově vychlazeného roztoku K-AC pro neutralizaci lyzačního roztoku. Zkumavka Eppendorf byla překlápěna po dobu 10 sekund, inkubována po dobu 5 minut v lednici a centrifugována po dobu 5 minut ve 4°C při 16 100g.

Supernatant byl přenesen bez kontaminace vzniklou sraženinou do čisté zkumavky Eppendorf a byl odečten jeho objem. K supernatantu byl přidán stejný objem roztoku fenol:chloroform:isoamylalkohol. Zkumavka byla řádně protřepána a centrifugována po dobu 5 minut při 4°C a 15 000g. Vrchní vodná fáze byla přenesena do čisté zkumavky Eppendorf. Při přenášení vodné fáze byl opět odečten její objem.

Do vodné fáze byl přidán stejný objem ledově vychlazeného isopropanolu. Roztok byl silně protřepán a ihned centrifugován při teplotě 4°C, 15 000g, po dobu 10 minut. Peleta byla promyta 100  $\mu$ l vychlazeným (-20°C) 75% roztokem ethanolu a centrifugována po dobu 10 minut při 16 100g a teplotě 4°C. Následně došlo k odsátí ethanolu. Peleta byla vysušena na Speed Vacu (DNA 110, Savant).

Do zkumavky s peletou bylo přidáno 19  $\mu$ l TE pufru nebo sterilní MQ vody a 0,5  $\mu$ l RNasy A (10 mg/ml). Roztok byl inkubován v předehřátém ohříváči bloků (LS1, VLM GmbH) na teplotu 50-55°C až do rozpuštění pelety. Následně probíhala inkubace ve 37°C po dobu 10 minut. Výsledný preparát DNA byl skladován při -20°C.

#### 3.4.14 Midipreparace plasmidové DNA

##### Použité roztoky:

- **roztok PEG:** 2,5M NaCl; 20% PEG (8000 nebo 6000)
- **ostatní roztoky:** stejné jako v kapitole 3.4.13, str. 41

Tato metoda byla použita pro získání velmi čisté plasmidové DNA, která byla následně odeslána k sekvenaci.

Nejprve bylo provedeno přeočkování bakteriálních buněk (viz kapitola 3.4.3, str. 32). Následující den bylo sterilně z 50ml zkumavky Falcon s buněčnou kulturou vyndáno párátka a buňky byly centrifugovány (Allegro X-22R, rotor 630) po dobu 5 minut, při 4 500 RPM. Supernatant byl odlit. Peleta byla pipetou resuspendována v 1 ml STE pufru, přenesena do 1,5 ml zkumavky Eppendorf a centrifugována (5415D/R, Eppendorf) po dobu 5 minut, při 4 500 RPM. Supernatant byl opět co nejdůkladněji odstraněn a peleta byla resuspendována v 200 µl GTE pufru. Bezprostředně po resuspendování bylo přidáno 300 µl čerstvě připraveného lyzačního roztoku. Zkumavka Eppendorf byla několikrát převrácena a inkubována po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 200 µl ledově vychlazeného K-AC roztoku. Zkumavka Eppendorf byla překlápěna po dobu 10 sekund, inkubována po dobu 5 minut v lednici a centrifugována 10 minut ve 4°C při 15 000g. Supernatant byl přenesen bez kontaminace vzniklou sraženinou do čisté zkumavky Eppendorf a byl odečten jeho objem. K supernatantu byl přidán stejný objem roztoku fenol:chloroform:isoamylalkohol. Zkumavka byla řádně protřepána a centrifugována po dobu 5 minut při 4°C a 15 000g. Vrchní vodná fáze byla přenesena do čisté zkumavky Eppendorf. Při přenášení vodné fáze byl opět odečten její objem. Při tvoření bílého proteinového rozhraní mezi vodnou a fenolovou fází byly provedeny další extrakce, dokud proteinové rozhraní nezmizelo, nebo dokud nebylo co nejmenší. Do extrahované vodné fáze byl přidán stejný objem chloroformu. Vše bylo řádně protřepáno a centrifugováno po dobu 5 minut, při 15 000g, při teplotě 4°C. Horní vodná fáze byla odebrána do čisté zkumavky Eppendorf.

Do vodné fáze byl přidán stejný objem isopropanolu. Roztok byl silně protřepán a ihned centrifugován při teplotě 4°C, 15 000g po dobu 30 minut. Peleta byla promyta vychlazeným (-20°C) 75% roztokem ethanolu a centrifugována po dobu 2 minut při 15 000g a teplotě 4°C. Následně byl odsán ethanol. Peleta DNA byla usušena na Speed Vacu (DNA 110, Savant). Do zkumavky s peletou bylo přidáno 100 µl TE pufru a 0,5 µl RNasy A (10 mg/ml). Roztok byl inkubován v předehřátém ohřívací bloku (LS1, VLM GmbH) na teplotu 50 - 55°C až do rozpuštění pelety a poté ve 37°C po dobu 10 minut. Dále bylo do roztoku pipetováno 60 µl roztoku PEG, který byl pomalu resuspendován špičkou. Připravený roztok byl držen na ledové tříšti po dobu jedné hodiny. Po uplynutí této doby byl roztok centrifugován po dobu 15 minut ve 4°C a při 15 000g. Vzniklý supernatant byl odstraněn a peleta byla dvakrát promyta 150 µl vychlazeného 75% ethanolu. Ethanol byl vždy po promytí odsán. Peleta DNA byla usušena na Speed Vacu.

Po usušení bylo k peletě přidáno 20 µl sterilní vody. Výsledný roztok byl inkubován v ohřívači bloků předehřátém na teplotu 50 - 55°C až do rozpuštění pelety. Výsledný vzorek DNA byl skladován při -20°C.

### 3.4.15 Příprava vzorků DNA na sekvenaci

Správnost připravených vektorů pCW/1A1mod\_histag a pCW/1A1wt\_histag byla ověřena sekvenováním v Laboratoři sekvenace DNA Univerzity Karlovy v Praze, Viničná 7. K sekvenaci bylo použito cca 600 ng vektorové DNA a primery byly použity ve výsledném množství 3,2 pmol.

Na sekvenaci vektoru pCW/1A1mod\_histag byly připraveny 3 zkumavky Eppendorf, které obsahovaly:

1. zkumavka: 2 µl vektorové DNA; 0,2 µl pCW - forw → doplněno sterilní vodou na celkový objem 14 µl (nasedal před tac promotory, ověřil neporušenost promotoru a část genu)
2. zkumavka: 2 µl vektorové DNA; 1 µl primeru - forward 2 → doplněno sterilní vodou na celkový objem 14 µl (nasedal za promotory a ověřil velkou část genu)
3. zkumavka: 2 µl vektorové DNA; 1 µl primeru - reverse → doplněno sterilní vodou na celkový objem 14 µl (nasedal za terminátor)

Sekvence CYP1A1wt\_histag byla ověřena pomocí primeru - forward 2 a primeru - reverse (viz zkumavky 2., 3.).

Použité primery ukazuje Tab. 5.

**Tab. 5:** Primery použité pro sekvenaci DNA.

Název	Sekvence
pCW - forw	5'- GTTTTGCACCATTCGATG - 3'
primer - forward 2	5'- GGATCAGCTTACTCC - 3'
primer - reverse	5'- CGTCTTCAAGCAGATCTG - 3'

### 3.4.16 Izolace CYP 1A1

#### Použité roztoky:

- **2xTSE pufr:** 100mM Tris-acetát; 500mM sacharosa; 0,5mM EDTA → pH 7,6

- **resuspendační pufr:** 100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 20% glycerol; 6mM octan hořečnatý; 10mM  $\beta$ -merkaptoethanol  $\rightarrow$  pH 7,4
- **SPH pufr:** 50mM Tris-acetát; 250mM sacharosa  $\rightarrow$  pH 7,6
- **solubilizační pufr:** 100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 20% glycerol; 1% E-911; 0,5M KCl; 5mM imidazol; 5mM  $\beta$ -merkaptoethanol; 30 $\mu$ M  $\alpha$ -NF rozpuštěný v methanolu (použit pouze při první izolaci)  $\rightarrow$  pH 7,5
- **pufr A (ekvilibrační):** 100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 20% glycerol; 0,5% E-911; 0,5M KCl; 5mM imidazol; 5mM  $\beta$ -merkaptoethanol  $\rightarrow$  pH 7,5
- **pufr B1:** 100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 20% glycerol; 0,5% E-911; 0,5M KCl; 40mM imidazol; 5mM  $\beta$ -merkaptoethanol  $\rightarrow$  pH 7,5
- **pufr B2, B3:** mají shodné složení s B1 jen byl použit 60mM (B2) či 80mM (B3) imidazol
- **pufr C:** 100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 20% glycerol; 0,5M KCl; 0,5% CHAPS; 40mM imidazol; 5mM  $\beta$ -merkaptoethanol  $\rightarrow$  pH 7,5
- **pufr D:** 100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 20% glycerol; 0,5M KCl; 0,5% CHAPS; 300mM imidazol; 5mM  $\beta$ -merkaptoethanol  $\rightarrow$  pH 7,5
- **pufr E:** 100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 20% glycerol; 0,1mM EDTA; 0,1mM DTT  $\rightarrow$  pH 7,5
- **pufr F:** 100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 20% glycerol; 0,1mM EDTA; 20% glycerol  $\rightarrow$  pH 7,5
- **roztok EDTA:** 100mM EDTA  $\rightarrow$  pH 8
- **MES pufr:** 20mM MES; 100mM NaCl  $\rightarrow$  pH 5,0

#### 3.4.16.1 Příprava sféroplastů

Narostlá buněčná kultura (viz kapitola 3.4.4.2, str. 34) byla chlazená po dobu 1 hodiny při 5°C v chladové místnosti a následně sklizena centrifugací (Janetzki K70D, MLW) při 3 000 RPM po dobu 30 minut a 4°C. Vzniklá peleta byla resuspendována v takovém objemu 2xTSE pufru, aby 1 ml pufru odpovídal 70 mg buněk. Následně bylo přidáno stejné množství vody a lysozym do výsledné koncentrace 0,1 mg/ml. Vzniklý roztok byl jemně míchán po dobu 30 minut v chladové místnosti. Sféroplasty byly sklizeny centrifugací (Allegro X-22R, rotor 630) po dobu 10 minut při 4 000g a rozmíchány v resuspendačním pufru v objemu 1 ml pufru na 0,5 g hmotnosti pelety. Poté byly sféroplasty zamrazeny v -80°C.

### **3.4.16.2 Dezintegrace sféroplastů**

Zmražené sféroplasty byly ponechány roztát při laboratorní teplotě. Poté byly k sféroplastům přidány inhibitory proteas, leupeptin do výsledné koncentrace 0,2μM; bestatin do výsledné koncentrace 1μM; aprotinin do výsledné koncentrace 0,04 U/ml a PMSF do výsledné koncentrace 1mM (PMSF byl rozpuštěn v isopropanolu). Vše bylo přeneseno do kádinky, která byla umístěna v ledové tříšti na magnetické míchačce. Za stálého chlazení byly sféroplasty sonikovány (Sonopuls HD 3100, Bandelin) pomocí sondy TE 76 30-ti sekundovými pulzy při 60W, a to celkem 9krát. Aby nedocházelo k zahřátí vzorku, byl vzorek mezi jednotlivými cykly ponechán cca 2 minuty v ledové tříšti. Dezintegrované buňky byly centrifugovány po dobu 10 minut při 10 000g a teplotě 4°C (Allegro X-22R, rotor 4250) z důvodu zachycení inkluzních tělísek.

### **3.4.16.3 Příprava membránové frakce**

Získaný supernatant po dezintegraci sféroplastů byl centrifugován (ultracentrifuga Optima™ LE-80K, Beckman Coulter; rotor Ti 45) při 40 000 RPM po dobu 65 minut při teplotě 4°C. Vzniklá peleta byla resuspendována v co nejmenším objemu SPH pufru a ponechána při 5°C dokud nebyla stanovena koncentrace bílkovin pomocí metody BCA (viz kapitola 3.4.20, str. 51).

### **3.4.16.4 Solubilizace proteinů z bakteriální membrány**

Získané membrány byly naředěny solubilizačním pufrém na výslednou koncentraci proteinu 2 mg/ml. Takto připravený roztok byl míchán po dobu 3 hodin v chladové místnosti. Po uplynutí této doby byl roztok centrifugován (ultracentrifuga Optima™ LE-80K, Beckman Coulter; rotor Ti 45) po dobu 65 minut, při 35 000 RPM a teplotě 4°C.

### **3.4.16.5 Chromatografie na koloně Ni-NTA**

Veškerá práce s kolonou byla prováděna v chladové místnosti. 5 ml Ni-NTA agarosy, uchovávané v 20% (v/v) ethanolu při 4°C, bylo promyto 25 ml destilované vody a ekvilibrováno 100 ml pufru A. Po solubilizaci byl supernatant obsahující CYP1A1 vsádkově smíchán s nosičem a míchán po dobu 40 minut při 4°C. Následně proběhla centrifugace (Allegro X-22R, rotor 4250) při 500g, po dobu 5 minut a při teplotě 4°C k usazení nosiče.

Ni-NTA agarosa s navázanými proteiny byla přenesena do chromatografické kolony. Při první izolaci byla kolona postupně promyta 50 ml pufru B1 s 40mM imidazolem, 25 ml pufru B2 s 60mM imidazolem, 5 ml pufru B3 s 80mM imidazolem a 25 ml pufru C

obsahujícího 0,5% CHAPS. Při druhé izolaci byl použit pouze jeden pufr B, a to B1 s 40mM imidazolem. Eluce CYP1A1 byla provedena pomocí 25 ml pufru D. Frakce obsahující cytochrom P450 1A1 byly spojeny a dialyzovány nejprve proti 2 l pufru E. Po hodině byl pufr E vyměněn za 2 l pufru F, který byl opět po hodině vyměněn za nové 2 l pufru F, ve kterém probíhala dialýza přes noc.

Použitý nosič byl promyt 25 ml MES pufru, 25 ml MQ vody a uskladněn ve 20% (v/v) ethanolu v lednici. V případě, že došlo ke změně barvy nosiče v důsledky ztráty  $\text{Ni}^{2+}$  iontů či jejich redukci, byla kolona po použití regenerována následujícím způsobem. Kolona byla promyta 50 ml MQ vody, následně 15 ml roztoku EDTA, 50 ml MQ vody, 15 ml 100mM  $\text{NiSO}_4$ , 50 ml MQ vody a nosič byl uskladněn ve 20% ethanolu v lednici.

#### 3.4.16.6 Zahuštění finálního preparátu

Finální preparát získaný po chromatografii na koloně Ni-NTA agarosy byl zakoncentrován pomocí Amicon® Ultra centrifugačních zkumavek (Millipore) s membránou s molekulární selektivitou (MWCO) 30 000.

Do 2 zkumavek byl nalit finální preparát a to tak, aby obě zkumavky měly stejnou hmotnost. Naplněné zkumavky byly vloženy do centrifugy (Z 383K, HERMLE) a několikrát centrifugovány při 3 500g, teplotě 4°C po dobu vždy 3 minut až do zahuštění preparátu na potřebný objem. Po každých třech minutách byl odlit filtrát a zahuštěný preparát byl od stěn filtru rozmíchán pipetováním. Takto získaný finální preparát byl zamražen v malých alikvotech v kapalném dusíku a uchován při -80°C.

#### 3.4.17 SDS elektroforéza

##### Použité roztoky:

- **pufr A:** 0,375M Tris-HCl; 0,1% SDS (w/v) → pH 8,8
- **pufr B:** 0,125M Tris-HCl; 0,1% SDS (w/v) → pH 6,8
- **polymerační roztok A:** 30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS (w/v) v pufru A
- **polymerační roztok B:** 30% akrylamid (w/v); 0,8% BIS (w/v) v pufru B
- **vzorkový pufr redukující** (4x koncentrovaný): 0,25M Tris-HCl; 8% SDS (w/v), 40% glycerol (v/v); 20% 2-merkapt ethanol (v/v); 0,012% bromfenolová modř (w/v) → pH 6,8
- **elektrodový pufr:** 0,025M Tris-HCl; 0,192M glycín; 0,1% SDS (w/v) → pH 8,3
- **barvicí lázeň:** 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v); 46% ethanol (v/v);

9,2% kyselina octová (v/v)

➤ **odbarvovací lázeň:** 25% ethanol (v/v); 10% kyselina octová (v/v)

Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS), používaná k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti, byla prováděna podle U. K. Laemmliho <sup>[57]</sup>.

Nejprve byla připravena elektroforetická aparatura (miniVE Vertical). Mezi dvě skla odmaštěná ethanolem byly dány dva spacers. Připravená skla byla vložena vertikálně do elektroforetické aparatury. Mezi ně byl pipetován 10% (w/v) separační gel, který byl převrstven destilovanou vodou a ponechán 30 minut ztuhnout. Následně byla voda odlita a vysušena filtračním papírem.

*Složení 10% separačního gelu:*

- 5 ml pufru A
- 2,5 ml polymeračního roztoku A
- 7,5  $\mu$ l TEMEDu
- 75  $\mu$ l persíranu amonného (100 mg/ml)

Na separační gel byl pipetován 4% (w/v) zaostřovací gel, do kterého byl vložen plastový deseti nebo patnácti jamkový elektroforetický hřeben k vytvoření jamek pro vzorky.

*Složení 4% (w/v) zaostřovacího gelu:*

- 2,6 ml pufru B
- 400  $\mu$ l polymeračního roztoku B
- 3  $\mu$ l TEMEDu
- 60  $\mu$ l persíranu amonného

Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byl do elektroforetické aparatury nalit elektrodový pufr a z gelu byl vyndán elektroforetický hřeben. Do vytvořených jamek byly pomocí Hamiltonovy stříkačky aplikovány připravené vzorky a markery molekulových hmotností. Vzorky byly připraveny tak, že potřebné množství vzorku bylo vhodně naředěno vodou a doplněno 4x koncentrovaným redukujícím vzorkovým pufrem. Takto připravené vzorky



byly považeny ve vodní lázni po dobu 5 minut a krátce centrifugovány (stolní minicentrifuga, Labnet). Nakonec byl spodní těsnicí díl elektroforetické aparatury otevřen a aparatura byla umístěna do vaničky naplněné elektrodoým pufrem. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 80 V po dobu 30 minut. Poté bylo napětí nastaveno na 150 V. Elektroforéza byla ukončena, jakmile bromfenolová modř, která byla součástí redukujícího pufru, doputovala ke spodnímu okraji separačního gelu.

Po skončení elektroforézy byla skla vyndána z elektroforetické aparatury a opatrně od sebe oddělena. Horní zaostřovací gel byl odstraněn a spodní separační gel byl vložen na 1 hodinu do Petriho misky s barvicí lázní. Následně byl gel vyndán a vložen do odbarvovací lázně. Po cca 1 hodině byla odbarvovací lázeň vyměněna za novou, ve které byl gel odbarvován přes noc na třepačce.

### 3.4.18 Western blotting

#### Použité roztoky:

- **přenosový pufr:** 0,025M Tris-HCl; 0,192M glycin → pH 8,3
- **blokovací roztok:** 5% (w/v) odtučněné sušené mléko v pufru PBS-Triton X-100
- **PBS-Triton X-100:** 1.8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,134M NaCl; 0,3% TRITON X-100 (v/v) → pH 7,2
- **roztok primární králičí polyklonální protilátky:** 10 ml blokovacího roztoku s 10 µl protilátky (1 mg/ml)
- **roztok sekundární protilátky:** 3 ml PBS-Triton X-100 s 2,5 µl sekundární protilátky
- **roztok substrátu pro alkalickou fosfatasu:** tableta SIMAFAST™ BCIP/NBT byla sonikací rozpuštěna v 10 ml destilované vody

„Western blot“ je analytická metoda známá také jako „imunoblot“. Slouží k detekci velmi malých koncentrací daného proteinu ve směsi proteinů pomocí specifické protilátky.

#### *3.4.18.1 Přenos proteinů z gelu na membránu*

Nejprve byla provedena vertikální SDS elektroforéza (viz kapitola 3.4.17, str. 47), ze které byl použit separační gel. Gel byl vložen na 10 minut do Petriho misky, která byla naplněna přenosovým pufrem obohaceným o 10% (v/v) methanol. Před vložením do Petriho misky byl gel změřen. Podle jeho velikosti bylo nastříháno 6 kusů

chromatografického papíru Whatman a PVDF membrána. První tři kusy chromatografického papíru Whatman byly namočený do přenosového pufru a vloženy na spodní díl (anodu) přenosového zařízení (Fastblot B43, Biometra). Mezitím byla PVDF membrána pinzetou vyjmuta z ochranného papíru a smáčena 15 sekund v methanolu, 1 minutu v destilované vodě a 5 minut v přenosovém pufru.

Připravená membrána byla pinzetou vložena na tři kusy chromatografického papíru Whatman, které již byly umístěny v přenosovém zařízení. Membrána byla převrstvena gelem a dalšími třemi kusy chromatografického papíru Whatman, které byly také namočený v přenosovém pufru. Všechny vrstvy byly stlačeny válečkem, z důvodu odstranění vzniklých vzduchových bublin. Nakonec byl přiložen vrchní díl (katoda) přenosového zařízení, který byl zapojen do zdroje napětí (EPS 301, Electrophoresis Power Supply, Amerham). „Western blot“ byl prováděn při konstantní hodnotě elektrického proudu  $3,5 \text{ mA/cm}^2$  gelu. Přenos trval po dobu 50 - 55 minut.

#### ***3.4.18.2 Detekce cytochromu P450 1A1 pomocí králičí protilátky***

Po skončení elektro přenosu byla membrána vyjmuta a opatrně vložena do Petriho misky s blokovacím roztokem a ponechána na třepačce po dobu 1 hodiny. Blokovací roztok byl poté odlit. Membrána byla umístěna do Petriho misky s roztokem primární králičí polyklonální protilátky a inkubována v chladové místnosti na třepačce (MR-1) přes noc. Druhý den byl roztok králičí protilátky odpipetován a uložen do  $-20^\circ\text{C}$  pro další použití. Membrána byla v čisté Petriho misce na třepačce promyta pufrům PBS-Triton X-100 a přemístěna do aparatury Snap i.d. (SNAP i.d.<sup>TM</sup> Protein Detection System, Millipore). Zde byla ještě membrána řádně promyta 3x 15 ml pufru PBS-Triton X-100 pro odstranění nenavázané primární protilátky. Membrána byla převrstvena připravenou sekundární protilátkou a inkubována po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Nenavázaná sekundární protilátka byla opět odstraněna promytím 3x 15 ml pufru PBS-Triton X-100. Poté byla membrána vložena na 5 minut do vody a následně do roztoku substrátu pro alkalickou fosfatasy. Reakce probíhající při vizualizaci proteinů byla zastavena ponořením membrány do destilované vody.

#### **3.4.19 Stanovení koncentrace cytochromu P450**

##### **Použité roztoky:**

- ✎ **fosfátový pufr:** 100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 20% (v/v) glycerol  $\rightarrow$  pH 7,5

Stanovení koncentrace cytochromu P450 byla provedena dle metody popsané Omurou a Satem<sup>[58]</sup>.

Vzorek byl vhodně naředěn fosfátovým pufrům do celkového objemu 2 ml. Do roztoku bylo přidáno několik krystalků dithioničitanu sodného (~ 5 mg) a roztok byl promíchán. Po rozpuštění dithioničitanu sodného byl roztok rozdělen do dvou maskovaných semimikrokyvet o optické dráze 1 cm. Na spektrofotometru (Spekord M40, Carl Zeiss Jena) byla změřena základní linie v rozsahu vlnových délek 400 až 490 nm. Po změření byl roztok ve vzorkové kyvetě opatrně probublán oxidem uhelnatým po dobu 60 sekund. Kyveta byla okamžitě uzavřena víčkem a utěsněna parafilmem. Následně byla vložena zpět do kyvetového prostoru. Diferenční spektrum bylo proměřeno vždy ihned po probublání a následně i po delších časových intervalech po promíchání obsahu obou kyvet.

Vztah pro výpočet koncentrace cytochromu P450:

$$c_{P450} = \frac{A_{450} - A_{490}}{\epsilon_{P450} \cdot l} \cdot \text{ředění}$$

$c_{P450} \Rightarrow$  koncentrace cytochromu P450 [ $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]

$A_X \Rightarrow$  absorbance při vlnové délce X nm

$\epsilon_{P450} \Rightarrow$  molární absorpční koeficient cytochromu P450 ( $\epsilon = 0,091 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ )

$l \Rightarrow$  optická dráha kyvety [cm]

### 3.4.20 Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA

#### Použité roztoky:

- **roztok A:** 0,4% NaOH; 0,95% NaHCO<sub>3</sub>; 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O; 0,16% vínan sodný → pH 11,25
- **roztok B:** 4% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O

Koncentrace proteinů byla stanovena modifikovanou metodou dle Wiechelmana a kol. pomocí 4,4'-dikarboxy-2,2'-bicinchnoninové kyseliny (BCA)<sup>[59]</sup>.

Příprava činidla potřebného ke stanovení proteinů probíhala tak, že bylo rozpuštěno potřebné množství BCA v 50 dílech roztoku A tak, aby výsledná koncentrace BCA byla

1% (w/v). Po rozpuštění BCA byl přidán 1 díl roztoku B. Činidlo bylo připraveno vždy těsně před použitím.

Do 96-jamkové destičky bylo pipetováno 9  $\mu$ l standardů nebo vodou vhodně zředěných stanovovaných vzorků a 260  $\mu$ l připraveného činidla. Jako standard pro sestavení kalibrační přímky byl použit roztok BSA o koncentraci 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 a 2 mg/ml. Slepé vzorky obsahovaly místo roztoku proteinů 9  $\mu$ l destilované vody a byly provedeny v tripletu stejně jako jednotlivé stanovované vzorky, každý standard byl měřen v dubletu. Destička byla uzavřena víčkem a vložena do inkubátoru na dobu 30 minut při 37°C (IR 1500 Automatic CO2 Incubator, Flow Laboratories). Po inkubaci a zchladnutí byla změřena absorbance vzorků při 562 nm na čtečce mikrotitračních destiček (Sunrise Absorbance Reader, Tecan). Naměřená data byla vyhodnocena v programu Kim32<sup>[60]</sup>.

### 3.4.21 Stanovení ethoxyresorufin-O-deethylasové aktivity

#### Použité roztoky:

- **pufr draselnofosfátový:** 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \rightarrow \text{pH } 7,4$
- **roztok resorufinu:** 10 $\mu$ M resorufin rozpuštěný v DMSO
- **roztok ER:** 0,2mM 7-ethoxyresorufin (ER) rozpuštěný v DMSO
- **roztok NADPH:** 5mM NADPH
- **roztok DLPC:** 5 mg/ml DLPC rozpuštěno v chloroformu
- **pufr HEPES/CHAPS:** 500mM HEPES  $\rightarrow \text{pH } 7,4$ ; 0,5 mg/ml CHAPS
- **roztok GSH:** 300mM GSH

Stanovení Ethoxyresorufin-O-deethylasové (EROD) aktivity cytochromu P450 1A1 bylo provedeno podle Burka a Mayera<sup>[61]</sup>.

Protože purifikovaný CYP1A1 je bez přítomnosti NADPH:CYP reductasy nefunkční, je třeba vytvořit rekonstituovaný systém obsahující CPR a DLPC, který vytváří liposomy a simuluje tak prostředí membrány endoplasmatického retikula. Pro přípravu rekonstituovaného systému byl do skleněných zkumavek pipetován roztok DLPC a následně odpařen pod atmosférou dusíku. Dále byl do zkumavky přidán roztok HEPES/CHAPS do výsledné koncentrace 50mM/0,05 mg/ml a GSH do výsledné koncentrace 3mM a doplněno destilovanou vodou (viz Tab. 6, str. 53). Takto připravený roztok byl sonikován po dobu 2x3 minut. Nakonec byly přidány purifikované preparáty

CYP1A1 do výsledné koncentrace  $1\mu\text{M}$  a CPR do výsledné aktivity  $50\text{ nmol cyt}_c\cdot\text{min}^{-1}$ . Zkumavky byly inkubovány po dobu 10 minut za laboratorní teploty na třepačce (Yellow line OS 2 basic, IKA-Werke GmbH & Co.KG).

**Tab. 6:** Koncentrace a objemy roztoků použitých pro přípravu rekonstituovaného systému.

	<b>DLPC (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>HEPES/CHAPS (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>GSH (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>H<sub>2</sub>O (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>CYP (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>CPR (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Celk. objem (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
<b>Zásobní roztok</b>	5 mg/ml	500mM/0,5 mg/ml	30mM	-	30 $\mu\text{M}$ /40 $\mu\text{M}$	19,1 $\mu\text{mol}$ <b>cyt<sub>c</sub>.min<sup>-1</sup></b>	-
<b>Výsledná koncentrace</b>	<b>1 mg/ml</b>	<b>50mM/0,05 mg/ml</b>	<b>3mM</b>	-	<b>1<math>\mu\text{M}</math></b>	<b>50nmol cyt<sub>c</sub>.min<sup>-1</sup></b>	-
<b>CYP1A1 (30<math>\mu\text{M}</math>)</b>	10	5	5	36	1,66	2,6	50
<b>CYP1A1 (40<math>\mu\text{M}</math>)</b>	10	5	5	36	1,25	2,6	50

Standardy pro sestavení kalibrační přímky byly připraveny ředěním zásobního roztoku resorufinu fosfátovým pufrům tak, aby bylo dosaženo finálních koncentrací 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3 a 0,4 $\mu\text{M}$ . Jako slepý vzorek byl použit samotný pufr. Fluorescence byla měřena na fluorimetru (Luminiscence Spectrometer LS-55, PerkinElmer) s 96 jamkovou čtečkou. Použitá excitační vlnová délka byla 530 nm, emisní vlnová délka byla 585 nm. Pro měření EROD aktivity CYP1A1 přítomného v rekonstituovaných systémech či mikrosomech premedikovaných Sudanem I, které byly použity jako pozitivní kontrola experimentu, byly připraveny reakční směsi o celkovém objemu 500  $\mu\text{l}$ . Tyto směsi obsahovaly různé množství RS či mikrosomů naředěných pufrům tak, aby sledovaný průběh reakce byl lineární alespoň po dobu 3 minut, a roztok ER do výsledné koncentrace 2,2 $\mu\text{M}$ . Každá takto připravená směs byla rozpipetována po 150  $\mu\text{l}$  do třech jamek mikrotitrační destičky. Do první jamky, která sloužila jako slepý vzorek, bylo přidáno 17  $\mu\text{l}$  pufru a do zbývajících dvou jamek bylo přidáno stejné množství 5mM roztoku NADPH (výsledná koncentrace 0,5mM). Tím byla zahájena reakce. Destička se vzorky byla umístěna do fluorimetru a byla měřena fluorescence v 60 sekundových intervalech po dobu 10 minut.

Enzymová aktivita CYP1A1 byla zjištěna porovnáním fluorescence reakcí vzniklého resorufinu se standardy a vyjádřena jako  $\text{pmol}_{\text{resorufinu}}/\text{min}\cdot\text{pmol}_{\text{CYP}}$ .

## 4 Výsledky

### 4.1 Příprava expresních vektorů

#### 4.1.1 pCW/1A1mod\_histag

Plasmid obsahující gen pro potkaní CYP1A1 byl získán darem od Prof. Strobela. Tento gen byl již modifikován a vložen do plasmidu pCW pomocí štěpících míst NdeI a HindIII. Na Obr. 11 je pro názornost ukázána sekvence DNA potkaního přirozeně se vyskytujícího (wt) CYP1A1.

```
ATGCCTTCTGTGTATGGATTCCCAGCCTTCACATCAGCCACAGAGCTGCTCTTGGCCGTCACCACATTCTGCC
TTGGATTCTGGGTGGTTAGAGTCACAAGAACCTGGGTTCCCAAAGGTCTGAAGAGTCCACCCGGACCCTGGGG
CTTGCCCTTCATGGGGGCACGTGCTGACCCTGGGGAAGAACCACACCTGTCACTGACAAAACCTGAGTCAGCAG
TATGGGGACGTGCTGCAGATCCGTATTGGCTCCACACCCGTGGTGGTGTGAGCGGCCTGAACACCATCAAGC
AGGCCCTGGTGAACAGGGGGATGACTTCAAAGGCCGGCCAGACCTCTACAGCTTCACACTTATCGCTAATGG
CCAGAGCATGACTTTCAACCCAGACTCTGGACCGCTGTGGGCTGCCCGCCGGCGCCTGGCCAGAAATGCGCTG
AAGAGTTTCTCCATAGCCTCAGACCCAACACTGGCATCCTCTTGCTACTTGGAAGAGCACGTGAGCAAAGAGG
CTGAATACTTAATCAGCAAGTTCCAGAAGCTGATGGCAGAGGTTGGCCACTTCGACCCTTTCAAGTATTTGGT
GGTGTGAGTGGCCAATGTCATCTGTGCCATATGCTTTGGCAGACGTTATGACCACGATGACCAAGAGCTGCTC
AGCATAGTCAATCTAAGCAATGAGTTTGGGGAGGTTACTGGTTCTGGATACCCAGCTGACTTCATTCTATCC
TCCGTTACCTCCCTAACTCTTCCCTGGATGCCTTCAAGGACTTGAATAAGAAGTTCTACAGTTTCATGAAGAA
GCTAATCAAAGAGCACTACAGGACATTTGAGAAGGGCCACATCCGGGACATCAGACAGCCTCATTGAGCAT
TGTCAGGACAGGAGGCTGGACGAGAATGCCAATGTCCAGCTCTCAGATGATAAGGTCATTACGATTGTTTTTG
ACCTCTTTGGAGCTGGGTTTGACACAATCACAACCTGCTATCTCTTGGAGCCTCATGTACCTGGTAACCAACCC
TAGGATACAGAGAAAGATCCAGGAGGAGTTAGACACAGTGATTGGCAGGGATCGGCAGCCCCGGCTTTCTGAC
AGACCTCAGCTGCCCTATCTGGAGGCCTTCATCCTGGAGACCTTCCGACATTCATCCTTTGTCCCATTACCA
TCCCCACAGCACCATAAGAGATACAAGTCTGAATGGCTTCTATATCCCCAAGGGACACTGTGTCTTTGTGAA
CCAGTGGCAGGTTAACCATGACCAGGAACCTATGGGGTGATCCAAACGAGTTCGGCCTGAAAGGTTTCTTACC
TCCAGTGGCACTCTGGACAAACACCTGAGTGAGAAGGTCATTCTCTTTGGTTTGGGCAAGCGAAAGTGCATTG
GGGAGACCATTTGGCCGACTGGAGGTCTTTCTCTTCTGGCCATCCTGCTGCAGCAAATGGAATTTAATGTGTC
ACCAGGCGAGAAGGTGGATATGACTCCTGCCTATGGGCTGACTTTAAACATGCCCGCTGTGAGCACTTCCAA
GTGCAGATGCGGTCTTCTGGTCCTCAGCATCTCCAGGCTTAG
```

**Obr. 11:** DNA sekvence potkaního wtCYP1A1.

Gen *CYP1A1* je v darovaném plasmidu již upraven odstraněním prvních 22 aminokyselin (Obr. 12 a) a jejich nahrazením kotvou (Obr. 12 b) výrazně připomínající často používanou kotvu hovězího CYP17A1 (Obr. 12 c). Proteinové změny zobrazuje Obr. 13, str. 55.

a) ATGCCTTCTGTGTATGGATTCCCAGCCTTCACATCAGCCACAGAGCTGCTCTTGGCCGTCACCACATTC...  
 b) ATGGCTCTGTTATTAGTAGTTGTGCTT-----TTC...  
 c) ATGGCTCTGTTATTAGCAGTTTTTCTG

**Obr. 12:** Nukleotidová sekvence počátku genu - a) wtCYP1A1, b) CYP1A1 s vyměněnými prvními 22 aminokyselinami, c) hovězího CYP17A1

- a) MPSVYGFPAFTSATELLLA VTT**FCLGFWVVRVTRTWVPKGLKSPPG**...
- b) **MALLLVVVL**-----**FCLGFWVVRVTRTWVPKGLKSPPG**...

**Obr. 13:** Aminokyselinová sekvence **a)** potkaního wtCYP1A1 <sup>[62]</sup>, **b)** modifikovaného CYP1A1. **Růžová** označuje modifikovanou membránovou kotvu.

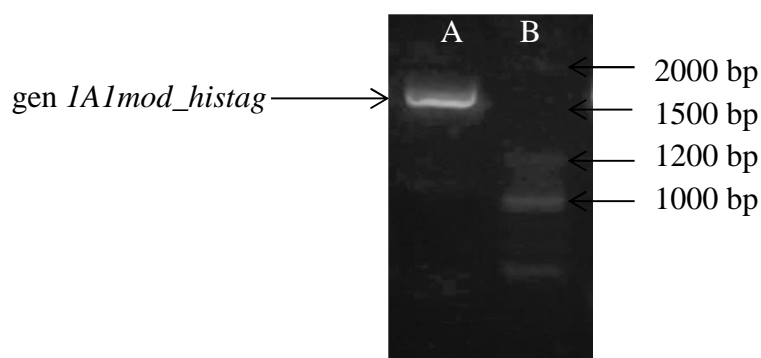
Popsaný gen *CYP1A1* byl amplifikován a dále modifikován použitím navržených primerů uvedených v kapitole 3.4.5. na str. 34.

Při navrhování forward primeru hrála roli přítomnost vnitřního místa NdeI, která zabraňovala přímému klonování do plasmidu. V sekvenci plasmidu pCW je ale dostupné štěpící místo BamHI, které se nachází za promotory *tac* a těsně před genem. Pro PCR amplifikaci sekvence genu i s touto částí plasmidu by bylo nutné navrhnout primery nasedající na promotory, avšak specifita takového primeru by nebyla dostatečná, neboť v této oblasti plasmid nese duplicitní sekvence obou následujících promotorů. Proto byl jako forward primer využit jeden ze sekvenačních primerů nasedající před sekvencí *tac* promotoru, tedy dostatečně daleko před gen.

Za pomoci reverse primeru bylo dosaženo následujících úprav:

- a) TAG stop kodon (Amber) byl vyměněn za dva stop kodony za sebou (TAATGA - Ochre a Opal) z důvodu vyššího výskytu této sekvence u bakteriálních často přepisovaných genů
- b) na C-konec proteinu byla vložena afinitní značka (his-tag), představovaná šesti histidiny (6xCAT) sloužící ke zjednodušení purifikace
- c) před afinitní značku byla vložena sekvence štěpícího místa XhoI (CTCGAG)
- d) za stop kodony bylo doplněno štěpící místo HindIII (AAGCTT)

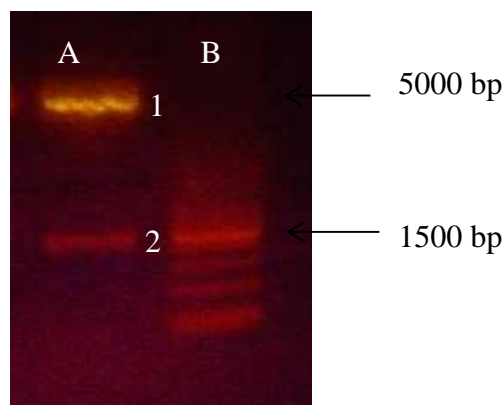
Produkt PCR, jehož předpokládaná velikost byla 1565 bp, byl přečištěn pomocí horizontální agarosové elektroforézy (Obr. 14, str. 56).



**Obr. 14:** Amplifikace insertu pCW/1A1mod\_histag s genem *CYP1A1mod\_histag*. A - produkt PCR (gen *CYP1A1mod\_histag* - 1565 bp), B - 2-log DNA ladder.

Protože gen bylo nutno vložit do plasmidu pomocí štěpících míst BamHI a HindIII, nebylo možné použít prázdný plasmid pCW\_MCS, který nese dvě štěpící místa BamHI. Jedno se nachází na správné pozici za promotory, ale druhé se nachází v polylinkeru za dalšími pomocnými sekvencemi a nebylo by možno jednoduše rozlišit gen vložený do správného rámce. Proto byl upravený gen ligován do parentálního plasmidu pCW/1A1mod, ze kterého byla působením BamHI a HindIII vyštěpena sekvence s původním genem *CYP1A1mod*.

Výsledný produkt štěpící reakce byl přečištěn pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 15).



**Obr. 15:** Dvojité štěpení plasmidu pCW/1A1mod pomocí restrikčních endonukleas BamHI a HindIII. A - plasmid pCW/1A1mod (1 - plasmid pCW, 4952 bp, 2 - gen *CYP1A1mod*, 1538 bp); B - 2-Log DNA ladder.

Po štěpení a izolaci plasmidu pCW a genu *CYP1A1mod\_histag*, z agarosového gelu byla provedena jejich ligace. Vzniklý produkt byl následně transformován do buněk DH5 $\alpha$ . Z nich byl izolován midipreparací konstrukt, dále nazývaný jako pCW/1A1mod\_histag, jehož správnost byla ověřena sekvenací DNA. Celkové schéma pracovního postupu pro přípravu expresního vektoru pCW/1A1mod\_histag zobrazuje Obr. 17 na str. 58.

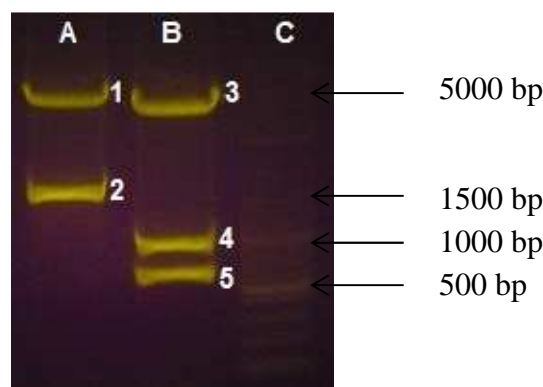


### 4.1.2 pCW/1A1wt\_histag

Jelikož jsme chtěli získat také neupravený potkaní protein CYP1A1, byl připraven i konstrukt nesoucí gen pro wtCYP1A1 v plasmidu pCW. Pro jeho přípravu byl využit námi vytvořený plasmid pCW/1A1mod\_histag, ze kterého byla působením endonukleas NdeI a XhoI vyštěpena sekvence genu *CYP1A1mod*, zatímco sekvence „histagu“ zůstala díky použití endonukleasy XhoI zachována.

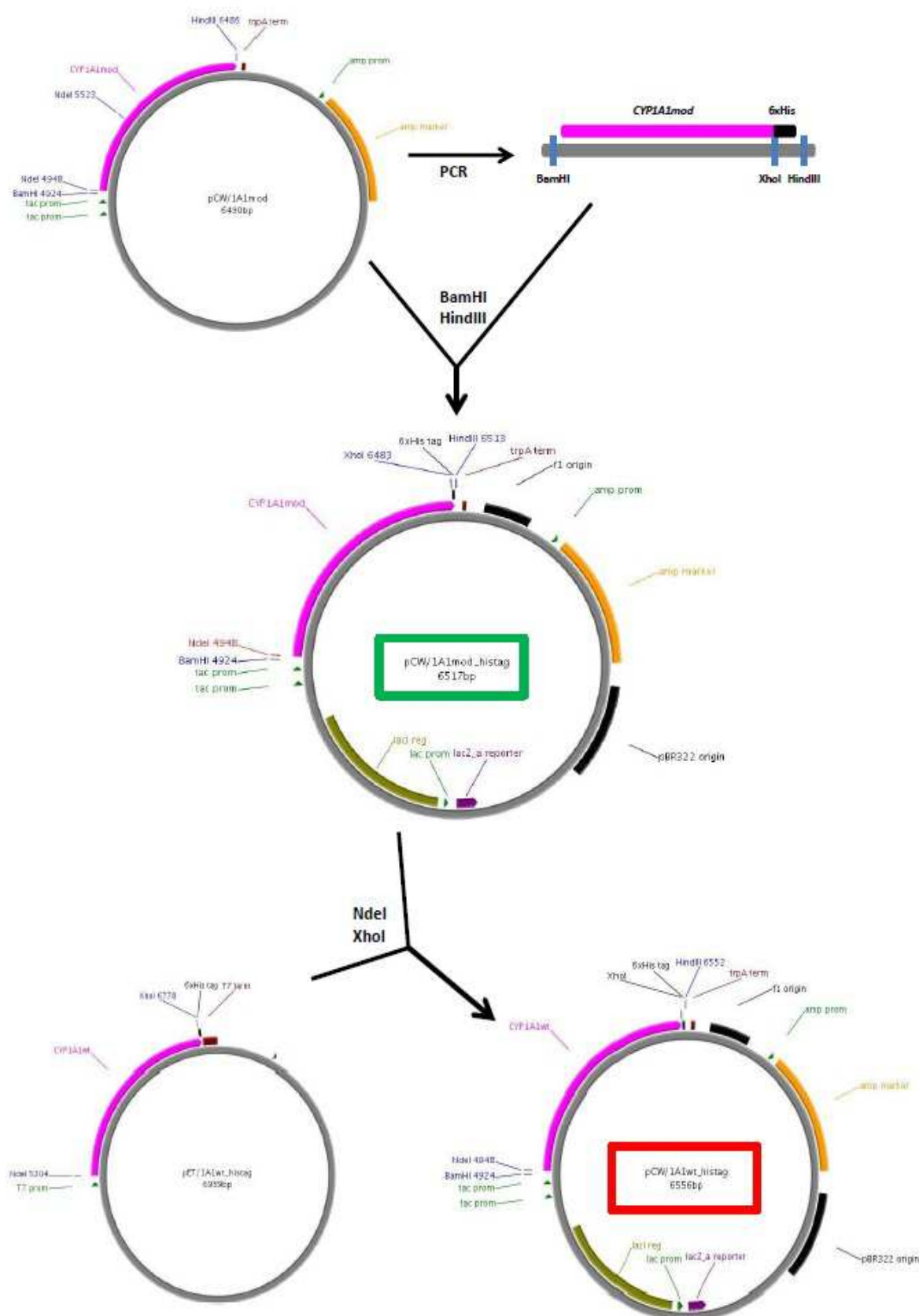
Plasmid pET/1A1wt\_histag, poskytnutý Mgr. M. Dvořákem, byl za účelem přípravy expresního vektoru pCW/1A1wt\_histag podroben dvojitému štěpení pomocí restrikčních endonukleas NdeI a XhoI. Gen získaný Mgr. Dvořákem byl syntetizován z jednotlivých oligonukleotidů, jejichž sekvence byla upravena podle „codon usage“, a tudíž se v tomto genu nevyskytuje vnitřní NdeI štěpící místo.

Výsledné produkty štěpení byly přečištěny pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 16).



**Obr. 16:** Příprava expresního vektoru pCW/1A1wt\_histag. A - plasmid pET/1A1wt\_histag štěpený restrikčními endonukleasami NdeI a XhoI. (1 - plasmid pET22b s afinitní značkou his-tag, 5365 bp; 2 - gen *CYP1A1wt*, 1574 bp) B - plasmid pCW/1Amod\_histag štěpený restrikčními endonukleasami NdeI a XhoI. (3 - plasmid pCW s afinitní značkou his-tag, 4982 bp; 4 - fragment NdeI (vnitřní) - XhoI genu *CYP1A1mod\_histag* 960 bp; 5 - fragment NdeI - NdeI genu *CYP1A1mod\_histag*, 575 bp); C - 2-Log DNA ladder.

Fragmenty označené na Obr. 16 jako 2, 3, tedy gen *CYP1A1wt* a plasmid pCW s afinitní značkou his-tag, získané izolací z agarosového gelu byly podrobeny ligaci. Vzniklý produkt pCW/1A1wt\_histag byl transformován do buněk DH5 $\alpha$ , z nich byl plasmid izolován midipreparací a následně ověřen sekvenací DNA. Celkové schéma pracovního postupu pro přípravu expresního vektoru pCW/1A1wt\_histag je znázorněn na Obr. 17 na str. 58.



**Obr. 17:** Schéma pracovního postupu pro přípravu expresních vektorů pCW/1A1wt\_histag a pCW/1A1mod\_histag. Vytvořeno v programu PlasMapper Version 2.0<sup>[63]</sup>.

## 4.2 Ověření připravených vektorů sekvenací

### 4.2.1 Sekvence vektoru pCW/1A1mod\_histag

Pro sekvenaci připraveného vektoru pCW/1A1mod\_histag byly použity tři primery (viz kapitola 3.4.14, str. 42). Primer pCW – forw, který byl použit při PCR jako forward, nasedal před promotory, ověřil neporušenost promotoru a část genu. Primer - forward 2 nasedal za tac promotory a ověřil velkou část genu. Reverse primer nasedal za terminátor a ověřoval gen odzadu.

Sekvence potvrdila správnost sekvence proteinového produktu CYP1A1mod\_histag. Co se týče správnosti genu, byla objevena 1 mutace odporující konsenzuální cDNA (viz Obr. 11, str. 54), která ale nemění aminokyselinové složení (Obr. 18).

ATGGCTCTGTTATTAGTAGTTGTGCTTTTCTGCCTTGGATTCTGGGTGGTTAGAGTCACAAGAACCTGGGTTC  
CCAAAGGTCTGAAGAGTCCACCCGGACCCTGGGGCTTGCCCTTCATAGGGCACGTGCTGACCCTGGGGAAGAA  
CCCACACCTGTCACTGACAAAAGTGAAGTCAGCAGTATGGGGACGTGCTGCAGATCCGTATTGGCTCCACACCC  
GTGGTGGTGTGCTGAGCGGCCTGAACACCATCAAGCAGGCCCTGGTGAAACAGGGGGATGACTTCAAAGGCCGGC  
CAGACCTCTACAGCTTCACTTATCGCTAATGGCCAGAGCATGACTTTCAACCCAGACTCTGGACCGCTGTG  
GGCTGCCCCGCCGGCGCCTGGCCCCAGAATGCGCTGAAGAGTTTCTCCATAGCCTCAGACCCAACTGGCATCC  
TCTTGCTACTTGAAGAGCACGTGAGCAAAGAGGCTGAATACTTAATCAGCAAGTTCCAGAAGCTGATGGCAG  
AGGTTGGCCACTTCGACCCTTTCAAGTATTTGGTGGTGTGAGTGGCCAATGTCATCTGTGCATATGCTTTGG  
CAGACGTTATGACCACGATGACCAAGAGCTGCTCAGCATAGTCAATCTAAGCAATGAGTTTGGGGAGGTTACT  
GGTCTGGATACCCAGCTGACTTCATTCCTATCCTCCGTTACCTCCCTAACTCTTCCCTGGATGCCTTCAAGG  
ACTTGAATAAGAAGTTCTACAGTTTCATGAAGAAGCTAATCAAAGAGCACTACAGGACATTTGAGAAGGGCCA  
CATCCGGGACATCACAGACAGCCTCATTGAGCATTGTCAGGACAGGAGGCTGGACGAGAATGCCAATGTCCAG  
CTCTCAGATGATAAAGTCATTACGATTGTTTTGACCTCTTTGGAGCTGGGTTTGACACAATCACAACCTGCTA  
TCTCTTGGAGCCTCATGTACCTGGTAACCAACCCTAGGATACAGAGAAAGATCCAGGAGGAGTTAGACACAGT  
GATTGGCAGGGATCGGCAGCCCCGGCTTTCTGACAGACCTCAGCTGCCCTATCTGGAGGCCTTCATCCTGGAG  
ACCTTCCGACATTCATCCTTTGTCCCATTCACCATCCCCACAGCACCATAAGAGATACAAGTCTGAATGGCT  
TCTATATCCCCAAGGGACACTGTGTCTTTGTGAACCAGTGGCAGGTTAACCATGACCAGGAAGTATGGGGTGA  
TCCAAACGAGTTCCGGCCTGAAAGGTTTCTTACCTCCAGTGGCACTCTGGACAAACACCTGAGTGAGAAGGTC  
ATTCTCTTTGGTTTGGGCAAGCGAAAGTGCATTGGGGAGACCATTGGCCGACTGGAGGTCTTTCTCTTCTGG  
CCATCTTGCTGCAGCAAATGGAATTTAATGTGTCAACAGGCGAGAAGGTGGATATGACTCCTGCCTATGGGCT  
GACTTTAAAACATGCCCGCTGTGAGCACTTCCAAGTGCAGATGCGGTCTTCTGGTCTCAGCATCTCCAGGCT  
CTCGAGCATCATCATCATCATTAATGAAAGCTT

**Obr. 18:** Nukleotidová sekvence upraveného genu *CYP1A1mod\_histag* vloženého do plasmidu pCW. **Růžově** je vyznačená modifikace N-terminální sekvence, **fialově** je označeno štěpící místo NdeI, **červeně** je označena mutace odporující potkaní konsenzuální cDNA, **žlutá** označuje dvě báze tvořící s červenou bází kodonový triplet, **tm. modře** je označené štěpící místo XhoI, **šedě** označená je vložená afinitní značka his-tag, **zeleně** je označený vložený dvojitý stop kodon, **tyrkysově** je označené štěpící místo HindIII.

### 4.2.2 Sekvenace vektoru pCW/1A1wt\_histag

Pro sekvenaci připraveného vektoru pCW/1A1wt\_histag byly použity pouze dva primery (viz kapitola 3.4.14, str. 42). Sekvenace potvrdila správnost sekvence celého genu *CYP1A1wt\_histag* (Obr. 19).

```
ATGCCGTCTGTTTACGGTTTCCCGGCGTTACCTCTGCGACCGAACTGCTGCTGGCGGTTACCACCTTCTGCC
TGGGTTTCTGGGTTGTTTCGTGTTACCCGTACCTGGGTTCCGAAAGGTCTGAAATCTCCGCCGGGTCCGTGGGG
TCTGCCGTTTCATCGGTACGTTTCTGACCCTGGGTAAAAACCCGCACCTGTCTCTGACCAAACCTGTCTCAGCAG
TACGGTGACGTTTCTGCAGATCCGTATCGGTTCTACCCCGGTTGTTGTTCTGTCTGGTCTGAACACCATCAAAC
AGGCGCTGGTTAAACAGGGTGACGACTTCAAAGGTCGTCCGGACCTGTACTCTTTACCCCTGATCGCGAACGG
TCAGTCTATGACCTTCAACCCGGACTCTGGTCCGCTGTGGGCGGCGCGTCGTCTGGCGCAGAACCGCGCTG
AAATCTTTCTCTATCGCGTCTGACCCGACCCTGGCGTCTTCTTGCTACCTGGAAGAACACGTTTCTAAAGAAG
CGGAATACCTGATCTCTAAATTCCAGAACTGATGGCGGAAGTTGGTCACTTCGACCCGTTCAAATACCTGGT
TGTTTCTGTTGCGAACGTTATCTGCGCGATCTGCTTCGGTCTGTCGTTACGACCACGACGACCAGGAACCTGCTG
TCTATCGTTAACCTGTCTAACGAGTTTGGTGAAGTTACCGGTTCTGGTTACCCGGCGGACTTCATCCCGATCC
TGCGTTACCTGCCGAACCTCTTCTCTGGACGCGTTCAAAGACCTGAACAAAAAATTCTACTCTTTCATGAAAAA
ACTGATCAAAGAACACTACCGTACCTTCGAAAAAGGTCACATCCGTGACATCACCGACTCTCTGATCGAACAC
TGCCAGGACCGTCTGCTGACGAAAACGCGAACGTTTACGCTGTCTGACGACAAAGTTATCACCATCGTTTTTCG
ACCTGTTTCGGTGCGGGTTTCGACACCATCACCACCGCGATCTCTTGGTCTCTGATGTACCTGGTTACCAACCC
GCGTATCCAGCGTAAATCCAGGAAGAACTGGACACCGTTATCGGTCTGACCGTCAGCCGCGTCTGTCTGAC
CGTCCGCAGCTGCCGTACCTGGAAGCGTTTCATCCTGGAACCTTCCGTCACTCTTCTTTTCGTTCCGTTTACCA
TCCCGCACTCTACCATCCGTGACACCTCTCTGAACGGTTTCTACATCCCGAAAGGTCACTGCGTTTTTCGTTAA
CCAGTGGCAGGTTAACACGACCAGGAAGTGTGGGGTGACCCGAACGAGTTTTCGTCCGGAACGTTTTCCTGACC
TCTTCTGGTACCCTGGACAAACACCTGTCTGAAAAAGTTATCCTGTTTCGGTCTGGGTAAACGTAAATGCATCG
GTGAAACCATCGGTCTGCTGGAAGTTTTCTGTTTCTGGCGATCCTGCTGCAGCAGATGGAGTTTAAACGTTTC
TCCGGGTGAAAAAGTTGACATGACCCCGGCGTACGGTCTGACCTGAAACACGCGCGTTGCGAACACTTCCAG
GTTTCAGATGCGTTCTTCTGGTCCGCAGCACCTGCAGGCGCTCGAGCATCATCATCATCATCATTAATGAAGC
TT
```

**Obr. 19:** Nukleotidová sekvence upraveného genu *CYP1A1wt\_histag* vloženého do plasmidu pCW. **Žlutě** je označené štěpící místo XhoI **Šedě** označená je vložená afinitní značka his-tag, **zeleně** je označený vložený dvojité stop kodon a **modře** je označené štěpící místo HindIII.

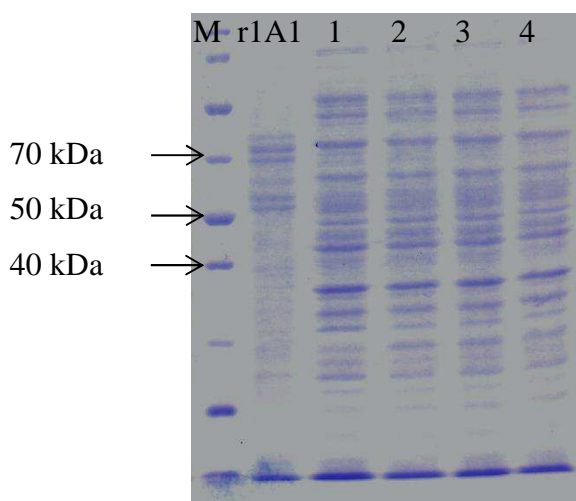
## 4.3 Exprese cytochromu P450 1A1

Množství CYP bylo vždy sledováno spektrofotometricky měřením CO spektra. Nativní CYP1A1 má po redukci a v komplexu s CO charakteristické maximum při 450 nm a biologicky neaktivní CYP vykazuje vrchol při 420 nm.

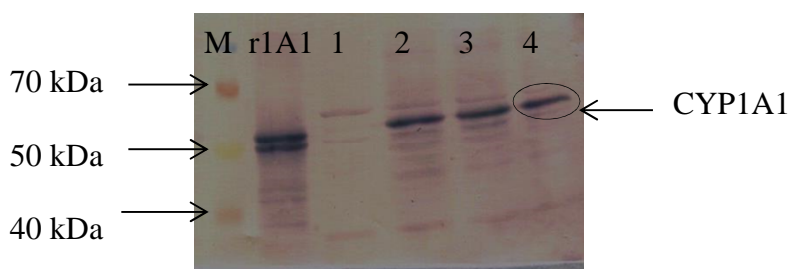
### 4.3.1 Exprese cytochromu P450 pomocí vektoru pET/1A1wt\_histag

Nejprve byla zkoušena exprese plasmidu pET/1A1wt\_histag získaného od Mgr. M. Dvořáka. Tímto plasmidem byly transformovány buňky *E.coli* BL-21GOLD(DE3) a inkubovány v LB médiu. Po nárůstu buněk do optické denzity ( $OD_{600}$ ) cca 0,6 až 0,8 byla teplota kultivace snížena z 37°C na 22°C a následně byla provedena indukce pomocí IPTG do výsledné 1mM koncentrace. Společně s IPTG byla do média přidána ALA do výsledné

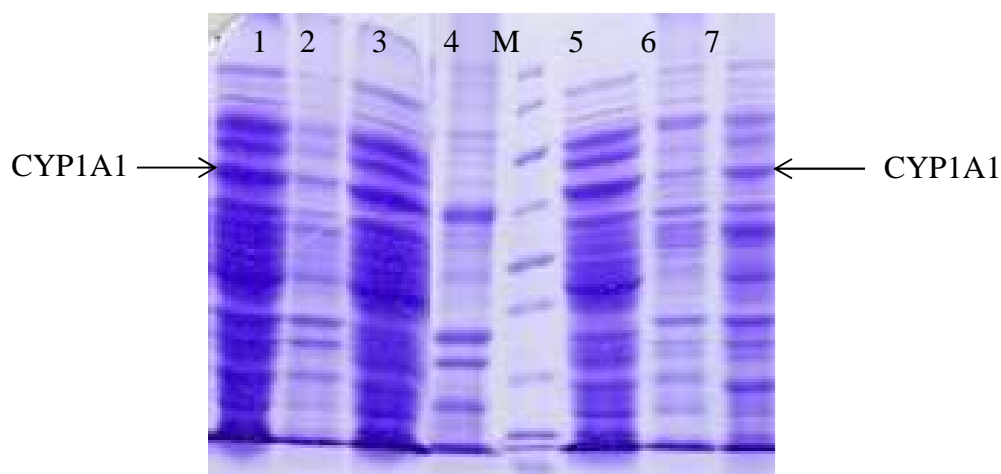
koncentrace 0,5mM. Expres byla ukončena po 24 hodinách. Pro sledování produkce CYP1A1 byla nejprve použita SDS elektroforéza, kde jako standard molekulových hmotností sloužil „*Broad Range Protein*“ marker (250 – 5kDa) a pro přesnější určení pozice CYP1A1 na gelu sloužil supersomální potkaní CYP1A1. Jelikož na SDS elektroforéze (Obr. 20) nebyl pozorován nárůst očekávaného produktu při 59 kDa a proužek o této velikosti je přítomen i před indukcí, může být exprimovaný CYP1A1 překryt jiným bakteriálním proteinem. Proto byla provedena citlivější metoda detekce, a to „western blotting“ za pomoci specifické primární protilátky (Obr. 21, str. 62). Tato metoda ukázala, že před indukcí nebyl produkován žádný CYP1A1, ten byl v malém množství detekován až ve vzorcích po indukci, ale bez navýšení produktu v čase. CYP1A1 je membránový protein, a proto jsme předpokládali, že bude produkován a inkorporován do membrán *E. coli*. Pro potvrzení této domněnky byla izolována membránová frakce z většího množství buněk, ve které by mělo dojít k nabožení obsahu CYP1A1. Z elektroforetického gelu (Obr. 22, str. 62) však vyplývá, že CYP1A1 je majoritně obsažen v inkluzních tělíscích. Následně byla ve výsledném preparátu membrán měřena CO spektra (Obr. 23, str. 62), pomocí kterých bylo zjištěno, že se jedná o nefunkční protein s absorbcí při 420 nm.



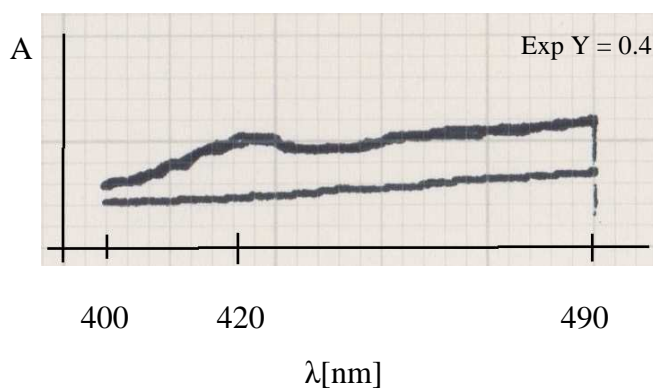
**Obr. 20:** SDS elektroforéza průběhu exprese pET/1A1wt\_histag v buňkách *E. coli* BL-21 GOLD(DE3). M - „*Broad Range Protein*“ marker [250 / 150 / 100 / 70 / 50 / 40 / 30 / 20 / 15 / 10 / 5kDa], r1A1 - supersomální potkaní CYP1A1, 1 - buňky před indukcí, 2 - 4 hodiny po indukci, 3 - 8 hodin po indukci, 4 - 12 hodin po indukci.



**Obr. 21:** „Western blot“ průběhu exprese pET/1A1wt\_histag v buňkách *E. coli* BL-21 GOLD(DE3). M - „*Multicolor Broad Range Protein*“ marker [260 - 10 kDa], r1A1 - supersomální potkaní CYP1A1, 1 - buňky před indukcí, 2 - 4 hodiny po indukci, 3 - 8 hodin po indukci, 4 - 12 hodin po indukci.



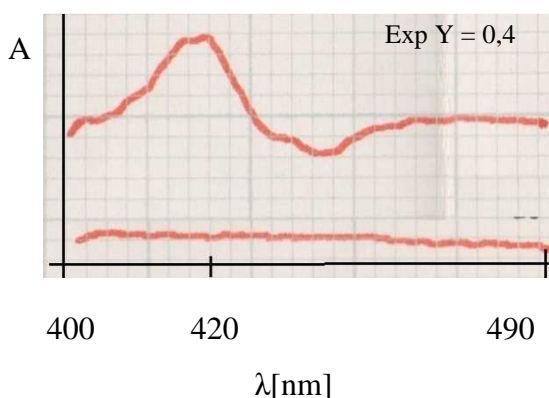
**Obr. 22:** Izolace membránové frakce. Na SDS elektroforézu byly vzorky aplikovány po 9  $\mu$ l s 3  $\mu$ l 4x konc. vzorkového pufru. Supernatant (dráha 1) a peleta (2) po sonikaci buněk; supernatant (3) a peleta (4) po centrifugaci inkluzních tělísek; „*Broad Range Protein*“ marker (M) [250 / 150 / 100 / 70 / 50 / 40 / 30 / 20 / 15 / 10 / 5 kDa]; supernatant (5) a peleta (6) po ultracentrifugaci; supersomální potkaní CYP1A1 (7).



**Obr. 23:** CO diferenční spektrum CYP1A1 exprimovaného v plasmidu pET. Spodní část grafu zobrazuje základní linii, horní část grafu ukazuje redukovanou formu vzorku v komplexu s oxidem uhelnatým.

### 4.3.2 Exprese cytochromu P450 1A1 pomocí vektoru pCW/1A1wt\_histag

Plasmid pCW/1A1wt\_histag byl transformován do buněk *E.coli* DH5 $\alpha$ . Po kultivaci vybraných kolonií metodou „single-cell colony“ byly buňky inkubovány v TB médiu. Po nárůstu buněk do OD<sub>600</sub> cca 0,6 až 0,8 došlo ke snížení teploty z 37°C na 30°C, přidání ALA do výsledné koncentrace 0,5mM a k indukci pomocí IPTG do výsledné koncentrace 1mM. Exprese byla ukončena po cca 24 hodinách od indukce. Z buněk byla izolována membránová frakce, ve které byla stanovena koncentrace CYP. Během měření však nebyl pozorován žádný vrchol u 450 nm značící aktivní CYP (Obr. 24).



**Obr. 24:** CO diferenční spektrum CYP1A1 exprimovaného v plasmidu pCW. Spodní část grafu zobrazuje základní linii, horní část grafu ukazuje redukovanou formu vzorku v komplexu s oxidem uhelnatým.

### 4.3.3 Exprese cytochromu P450 1A1 pomocí vektoru pCW/1A1mod\_histag

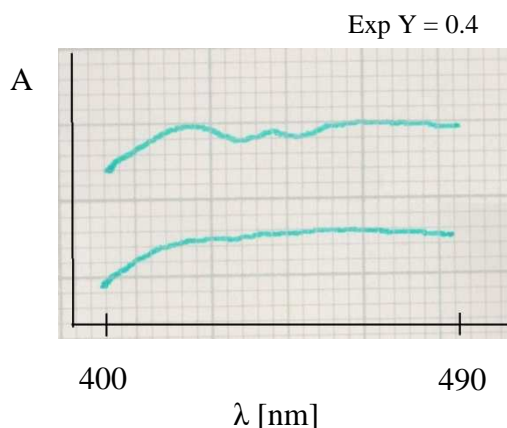
Pomocí následujících expresí byl testován vliv buněk *E. coli* DH5 $\alpha$  a DH5 $\alpha$  s různými vnesenými plasmidy, odlišných růstových médií, koncentrace IPTG a doby produkce na výtěžky CYP1A1.

Připravený expresní vektor pCW/1A1mod\_histag byl transformován do buněk *E.coli*. Vybrané kolonie byly kultivovány metodou „single-cell colony“. Získaná buněčná kultura byla zamražena pro další použití. Se všemi transformovanými buňkami byly provedeny testovací exprese, při kterých se neměnily následující podmínky. Transformované buňky byly inkubovány při teplotě 37°C a 220 RPM do nárůstu buněk do OD<sub>600</sub> cca 0,6 až 0,8. Poté došlo ke snížení teploty na 30°C a otáček na 150 RPM.

Jako negativní kontrola exprese CYP1A1 byly používány buňky *E. coli* DH5 $\alpha$  bez transformace jakýmkoliv plasmidem nebo s plasmidem pCW\_MCS, který neobsahoval gen



pro CYP1A1. Pomocí CO spektra (Obr. 25) bylo prokázáno, že se v tomto případě žádný cytochrom P450 neprodukoval.



**Obr. 25:** CO diferenční spektrum buněk *E. coli* DH5α s plasmidem pCW\_MCS. Spodní část grafu zobrazuje základní linii, horní část grafu ukazuje redukovanou formu vzorku v komplexu s oxidem uhelnatým.

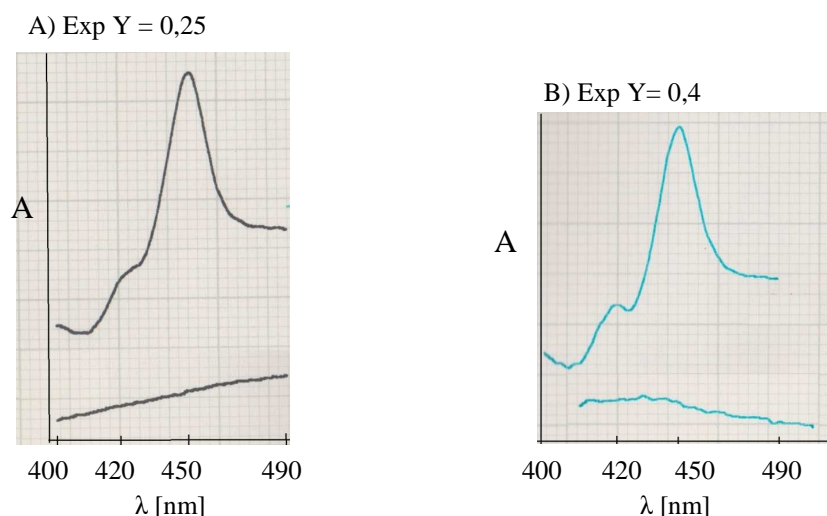
Pro ověření předpokladu, že TB-médium umožňuje vyšší výtěžek proteinu než LB-médium, byly provedeny exprese v obou médiích s expresním vektorem, který byl transformován do buněk DH5α. Indukce byla provedena přidáním IPTG do 1mM koncentrace. Současně byla přidána ALA do výsledné koncentrace 0,5mM. Dosažená koncentrace CYP po 24 hodinách exprese v LB-médiu byla  $78 \pm 16$  nmol/l a v TB-médiu  $493 \pm 44,6$  nmol/l. Proto bylo pro následující exprese použito již jen TB-médium.

Následující exprese sloužila ke zjištění, zda mají různé koncentrace induktoru IPTG vliv na výtěžek produkce CYP1A1. Pro produkci byl použit expresní vektor transformovaný do buněk DH5α. Indukce exprese byla provedena do výsledné koncentrace 0,5mM nebo 1mM IPTG. Zároveň byla pokaždé přidána ALA do výsledné koncentrace 0,5mM. Koncentrace CYP1A1 po 24 hodinách při indukci 0,5mM IPTG byla  $692 \pm 75,5$  nmol/l a při koncentraci 1mM byla  $493 \pm 44,6$  nmol/l. To znamená, že při použití IPTG o nižší koncentraci byla produkce CYP1A1 vyšší. Z tohoto důvodu byl pro další exprese používán induktor IPTG ve výsledné koncentraci 0,5mM.

Další exprese zkoumaly jaký vliv má doba produkce na výtěžek CYP1A1. Produkce probíhaly po dobu 24 a 48 hodin. Pro experiment byl použit expresní vektor transformovaný do buněk DH5α. Indukce exprese byla provedena pomocí IPTG s přídatkem ALA do výsledných koncentrací 0,5mM. Koncentrace CYP po 24 hodinách byla  $692 \pm 75,5$  nmol/l a po 48 hodinách  $848 \pm 12,3$  nmol/l. Srovnáním diferenčních spekter (Obr. 26, str. 65) bylo zjištěno, že ani po 48 hodinách produkce nedochází k nárůstu vrcholu při 420 nm, který by



mohl znamenat poškození proteinu. Pro dosažení časové úspory při optimalizačních experimentech byla dále volena doba produkce pouze 24 hodin, přestože se množství produkovaného CYP s časem zvyšuje.



**Obr. 26:** CO diferenční spektrum CYP1A1 exprimovaného v pCW po produkci A – 24 hodin, B – 48 hodin. Spodní část grafu zobrazuje základní linii, horní část grafu ukazuje redukovanou formu vzorku v komplexu s oxidem uhelnatým.

Další experiment ověřoval, zda je při produkci CYP1A1 opravdu nutné použití ALA. Pro expresi byl použit stejný vektor, který byl transformovaný do buněk DH5 $\alpha$ . Expres byla indukována pomocí IPTG do výsledné koncentrace 0,5mM nebo 1mM bez přídavku ALA. Koncentrace CYP po 24 hodinách exprese při indukci IPTG ve výsledné koncentraci 0,5mM byla  $328 \pm 31,8$  nmol/l a ve výsledné koncentraci 1mM byla  $270 \pm 29,9$  nmol/l. Porovnáním exprese s použitím a bez použití ALA vyplývá, že exprese s použitím ALA poskytuje vyšší výtěžek.

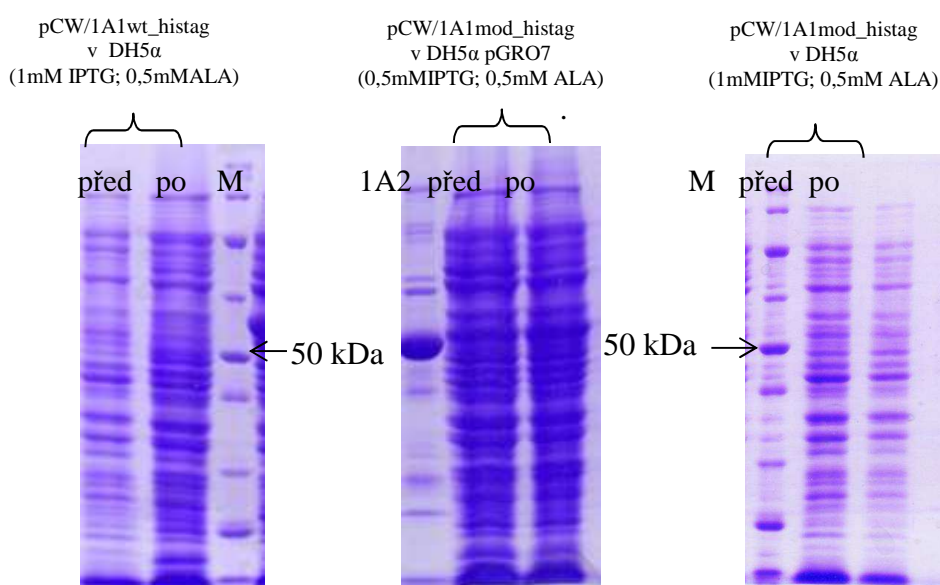
V další testovací expresi bylo ověřováno, zda může být drahý prekurzor hemu ALA nahrazen plasmidem pHg1. Plasmid pHg1 exprimuje glutamyl-tRNA reduktasu, což je klíčový enzym podílející se na biosyntéze hemu v *E. coli* <sup>[44]</sup>. Pro tento pokus byl opět použit expresní vektor transformovaný do buněk DH5 $\alpha$ , ve kterých byl již vnesený plasmid pHg1. Indukce byla provedena pomocí IPTG, a to do výsledné koncentrace 0,5mM nebo 1mM a v žádném případě nebyla přidána ALA. Koncentrace CYP při indukci IPTG ve výsledné koncentraci 0,5mM byla  $576 \pm 30,5$  nmol/l a ve výsledné koncentraci 1mM byla  $430 \pm 27,7$  nmol/l. Bylo zjištěno, že ve srovnání s experimentem, kdy byla do média při indukci exprese proteinu přidána ALA, byl výtěžek této produkce CYP srovnatelný.

Výsledky tedy potvrdily, že je možné ALA nahradit buňkami DH5 $\alpha$  s vneseným plasmidem pHg1.

Jako další byla vyzkoušena exprese CYP1A1 v buňkách DH5 $\alpha$  obsahující zároveň plasmid pGRO7 pro produkci chaperonu. Tento gen je vložený pod arabinosovým promotorem, proto byla při indukci do média s IPTG zároveň přidávána L-arabinsosa. Chaperony jsou proteiny, které v buňce pomáhají skládat většinu bílkovin do jejich správného prostorového uspořádání. Při indukci exprese byla současně přidána ALA do výsledné koncentrace 0,5mM a L-arabinsosa do výsledné koncentrace 1 mg/ml. Koncentrace CYP při této expresi byla  $514 \pm 49,3$  nmol/l. Porovnáním výsledných koncentrací CYP všech expresí bylo zjištěno, že se použitím buněk DH5 $\alpha$  s pGRO7 produkce nezvýšila.

Podmínky všech expresí a dosažené koncentrace CYP udává Tab. 7 a Obr. 28 na str. 67.

I průběh těchto expresí byl sledován pomocí SDS elektroforézy (Obr. 27), avšak v žádném z výše zmíněných případů nebyl na elektroforéze pozorován viditelný nárůst množství proteinu v oblasti 59 kDa, ačkoliv pomocí CO spektra byl potvrzen vznik nativního CYP1A1. Vzorky mohou obsahovat i jiný protein se stejnou molekulovou hmotností jako CYP1A1, což znemožňuje jeho vizualizaci SDS elektroforézou. CYP1A1 ani po 24 hodinách exprese není v buňkách přítomen jako majoritní protein.

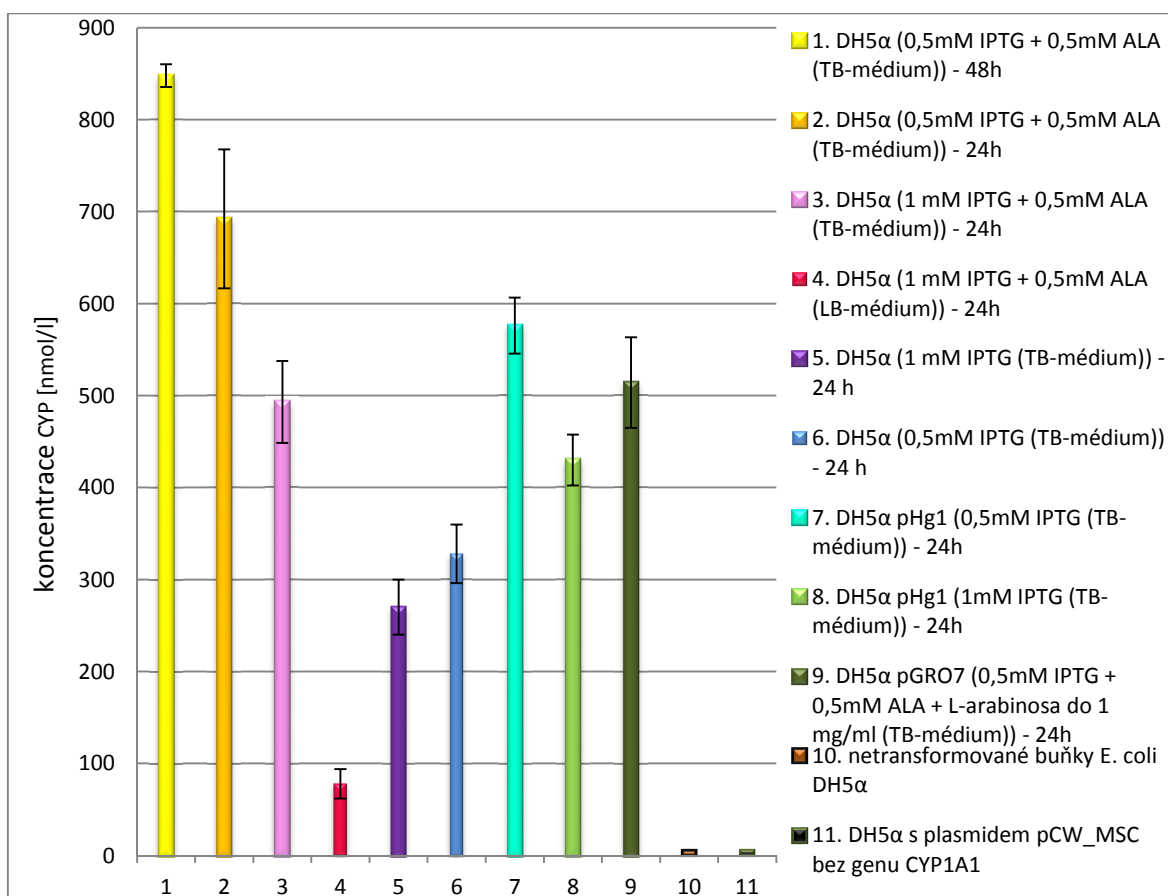


**Obr. 27:** Ukázka - SDS elektroforézy vzorků z průběhů různých expresí. Před – před indukcí IPTG; po – 24 hodin po indukci IPTG; 1A2 - standard lidského rekombinantního CYP1A2; M - *Broad Range Protein* marker [250 / 150 / 100 / 70 / 50 / 40 / 30 / 20 / 15 / 10 / 5 kDa].

**Tab. 7:** Shrnutí podmínek jednotlivých expresí pomocí vektoru pCW/1A1mod\_histag;  $c_{\text{IPTG}}$  - koncentrace IPTG,  $c_{\text{ALA}}$  - koncentrace  $\delta$ -aminolevulové kyseliny,  $c_{\text{CYP}}$  - koncentrace CYP1A1.

číslo měření	$c_{\text{IPTG}}$ [mM]	$c_{\text{ALA}}$ [mM]	médium	dobu produkce [h]	expresní kmen	$c_{\text{CYP}}$ [nmol/l]
1	0,5	0,5	TB	48	DH5 $\alpha$	848 $\pm$ 12,3
2	0,5	0,5	TB	24	DH5 $\alpha$	692 $\pm$ 75,5
3	1	0,5	TB	24	DH5 $\alpha$	493 $\pm$ 44,6
4	1	0,5	LB	24	DH5 $\alpha$	78 $\pm$ 16,0
5	0,5	-	TB	24	DH5 $\alpha$	270 $\pm$ 29,9
6	1	-	TB	24	DH5 $\alpha$	328 $\pm$ 31,8
7	0,5	-	TB	24	DH5 $\alpha$ pHg1	576 $\pm$ 30,5
8	0,5	-	TB	24	DH5 $\alpha$ pHg1	430 $\pm$ 27,7
9	0,5	0,5	TB	24	DH5 $\alpha$ pGRO7	514 $\pm$ 49,3
10	0,5	-	TB	24	DH5 $\alpha$	0
11	0,5	-	TB	24	DH5 $\alpha$	0

\* Hodnoty koncentrace CYP jsou uvedené jako průměr 3 měření se směrodatnou odchylkou.



**Obr. 28:** Porovnání koncentrací CYP pro jednotlivé podmínky exprese. Produkce probíhala vždy při 30°C po indukci IPTG při různých koncentracích a při optické densitě cca 0,6 až 0,8.

Z výsledků testovacích expresí bylo zjištěno, že nejvyšší produkce po 24 hodinách bylo dosaženo v buňkách *E.coli* DH5 $\alpha$ , v modifikovaném TB médiu, při koncentraci IPTG 0,5mM a s přidáním ALA do výsledné koncentrace 0,5mM. Pro velkoobjemovou produkci CYP1A1 pro purifikaci proteinu byly právě proto vybrány tyto podmínky jako nejvhodnější. Jen doba produkce byla prodloužena na 48 hodin, čímž se ještě zvyšuje množství CYP1A1.

## 4.4 Izolace potkaního cytochromu P450 1A1

V rámci této bakalářské práce byly provedeny dvě izolace potkaního CYP1A1

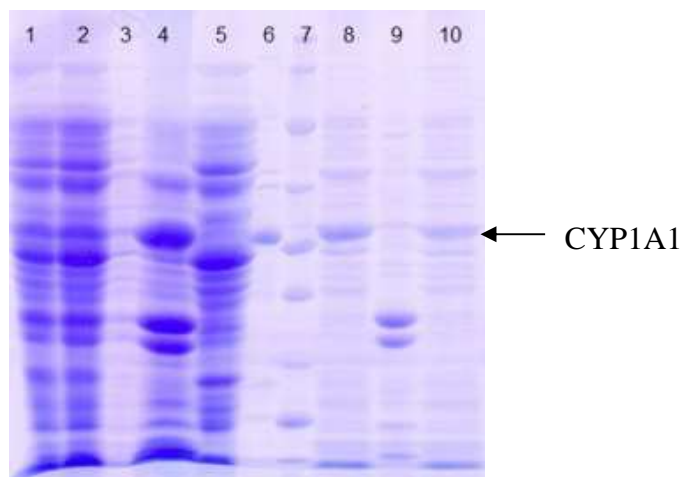
### 4.4.1 První izolace CYP1A1

Z buněk, získaných velkoobjemovou produkcí a sklizených centrifugací, byly připraveny sféroplasty. Ty byly podrobeny sonikaci a následné frakční centrifugaci, jejímž cílem bylo získání membránové frakce, ve které by měl být CYP1A1 majoritně přítomen. Z SDS elektroforézy znázorňující průběh izolace CYP1A1 (Obr. 29, str. 69) vyplývá, že většina CYP1A1 se skutečně nacházela v membránách (dráha 4). Úspěšnost solubilizace byla veliká, nedošlo k solubilizaci dvou majoritních kontaminujících proteinů (dráha 9), což vedlo k načištění purifikovaného proteinu.

Získané membrány byly solubilizovány v solubilizačním pufru, ve kterém byl přítomen  $\alpha$ -NF. Ten byl použit z důvodu ochrany CYP1A1 před denaturací detergenty.

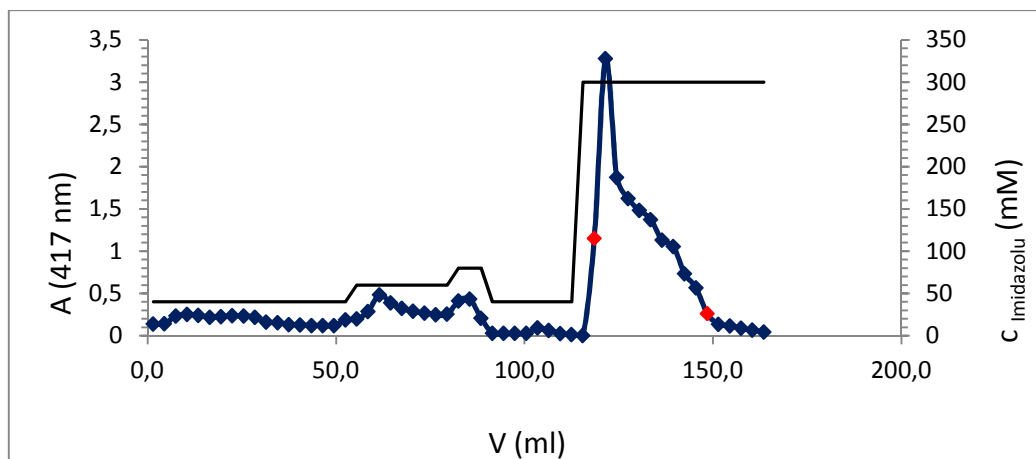
Solubilizát byl poté vsádkově smíchán s ekvilibrovaným Ni-NTA nosičem. Po 40 minutách míchání a následné centrifugaci byl nosič s navázanými proteiny převeden do chromatografické kolony. Již v ekvilibračním pufru byla obsažena nízká koncentrace imidazolu potlačující nespecifickou interakci ostatních proteinů s nosičem.

SDS elektroforéza vzorku solubilizátu zbylého po navázání proteinů na Ni-NTA nosič prokázala, že nedošlo k navázání veškerého CYP1A1 obsaženého v solubilizátu. To může být způsobeno možným poškozením afinitní kotvy proteinu nebo prostředím, ve kterém se pracuje s detergenty. Detergenty mohou v určité koncentraci částečně vytvořit micely a znepřístupnit tak kotvu pro vazbu s kolonou.

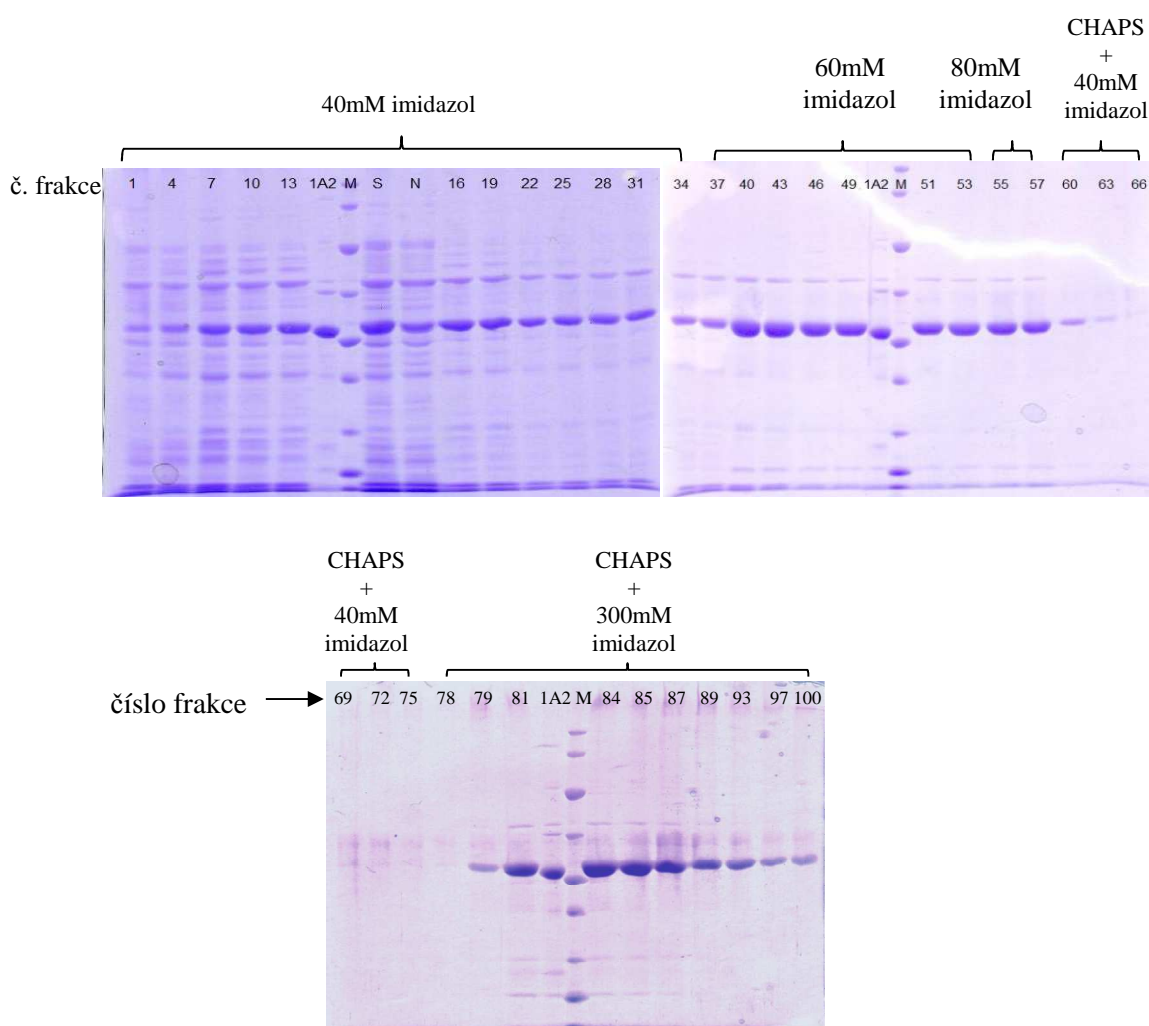


**Obr. 29:** Průběh první izolace potkaního CYP1A1. 1 - sonikované sféroplasty (3  $\mu$ l); 2 - supernatant inkluzních tělísek (4  $\mu$ l); 3 - inkluzní tělíška (4  $\mu$ l); 4 - membrány (2  $\mu$ l); 5 - supernatant membrán (11  $\mu$ l); 6 - lidský rekombinantní CYP1A2 (2  $\mu$ l); 7 - „*Broad Range Protein*“ marker (7  $\mu$ l) [250 / 150 / 100 / 70 / 50 / 40 / 30 / 20 / 15 / 10 / 5 kDa]; 8 - solubilizát (18  $\mu$ l); 9 - peleta po solubilizaci (9  $\mu$ l); 10 - proteiny nenavázané Ni-NTA agarosou (18  $\mu$ l). Objem v závorkách uvádí, kolik vzorku (doplněno destilovanou vodou na objem 18  $\mu$ l) bylo přidáno ke 4x konc. vzorkovému pufru.

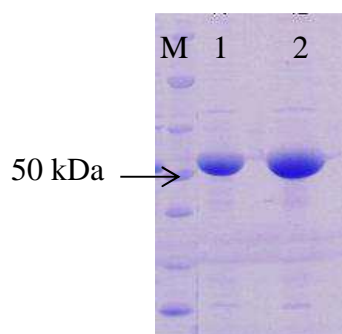
Kolona byla postupně promyta pufrů B1-3, přičemž byly jímány frakce o objemu 1,5 ml a v nich sledována absorbance při 417 nm (Obr. 30, str. 70). Sledování eluce všech proteinů při 280 nm bylo znemožněno přítomností detergentu, který v této oblasti rovněž absorbuje. Nejprve byla kolona promyta 50 ml pufru B1 s 40mM imidazolem (frakce 1 - 36), dále 25 ml pufru B2 s 60mM imidazolem (frakce 37 - 54) a na závěr 5 ml pufru B3 s 80mM imidazolem (frakce 55 - 59). Zvyšující se koncentrace imidazolu v promývacích pufrch měla posloužit k odmytí nespecificky navázaných či slabě navázaných kontaminujících proteinů, které se přirozeně vyskytují v *E. coli*. Jak je patrné z elektroforéz dokumentujících průběh chromatografie a čistotu jednotlivých frakcí (Obr. 31, str. 70), tak při vyšších koncentracích imidazolu (60, 80mM) docházelo k výraznému uvolňování CYP1A1 z nosiče, a to ve vysoké čistotě, bez kontaminujících proteinů. Proto byly tyto promývací kroky v další izolaci vynechány. Následující promytí kolony 25 ml pufru C (frakce 60 - 76) sloužilo k převedení preparátu do detergentu CHAPS, který lze, na rozdíl od detergentu E-911, následně odstranit dialýzou. Eluce CYP1A1 byla provedena izokraticky pomocí pufru D obsahujícího 300mM imidazol (frakce 77 - 107). Frakce obsahující cytochrom P450 1A1 (frakce 79 - 97) byly spojeny a dialyzovány přes noc. Po dialýze byl preparát zahuštěn na objem 6,25 ml, v malých alikvotech zamražen v tekutém dusíku a skladován v - 80°C. Čistotu finálního preparátu CYP1A1 zobrazuje Obr. 32 na str. 71.



**Obr. 30:** Eluční profil chromatografie na Ni-NTA agarose. Frakce nacházející se mezi červeně označenými body (frakce 79 - 97) byly spojeny pro dialýzu.



**Obr. 31:** Frakce získané z Ni-NTA agarosu. Promývání kolony pufrém B1 s 40mM imidazolem (frakce 1 - 36), pufrém B2 s 60mM imidazolem (frakce 37 - 54), pufrém B3 s 80mM imidazolem (frakce 55 - 59), pufrém C obsahující 0,5% CHAPS (frakce 60 - 76) a eluce 300mM imidazolem (frakce 77 - 107). 1A2 - standard lidského rekombinantního CYP1A2, M - „Broad Range Protein“ marker [250 / 150 / 100 / 70 / 50 / 40 / 30 / 20 / 15 / 10 / 5 kDa], S- solubilizát, N- proteiny nenavázané Ni-NTA agarosou.



**Obr. 32:** SDS elektroforéza finálního preparátu CYP1A1. M - „Broad Range Protein“ marker [250 / 150 / 100 / 70 / 50 / 40 / 30 / 20 / 15 / 10 / 5 kDa], 1 - finální preparát CYP1A1 (3 µl), 2 - finální preparát CYP1A1 (10 µl). Objem v závorkách uvádí, kolik vzorku (doředěno destilovanou vodou na objem 18 µl) bylo přidáno ke 4x konc. vzorkovému pufru.

Průběh celé izolace byl sledován také spektrofotometrickým měřením koncentrace CYP a obsahu proteinů pomocí metody BCA v jednotlivých krocích izolace. Z tabulky celkového průběhu purifikace CYP1A1 (Tab. 8) je patrné, že v supernatantu inkluzních tělísek je větší koncentrace CYP než ve sféroplastech. To mohlo být způsobeno tím, že sonikací došlo k rozrušení sféroplastů a cytochrom P450 1A1 byl přístupnější pro měření. Dále je patrné, že při získání membrán dochází ke ztrátě většiny buněčných proteinů mimo CYP1A1. Ztráta části cytochromu je nejspíše způsobená tím, že část CYP není do membrán inkorporována nebo v průběhu izolace a získávání membrán mohla být kotva proteolyticky odštěpena. K největším ztrátám CYP1A1 došlo během solubilizace, protože  $\alpha$ -NF nejspíše nestabilizuje všechny CYP1A1, a proto dochází k jeho denaturaci a ke ztrátě.

Při první izolaci bylo získáno 188 nmolů CYP1A1, což odpovídá výtěžku 16 %. Specifický obsah preparátu je 13 nmol CYP/mg<sub>prot.</sub>

**Tab. 8:** Celkový průběh první purifikace potkaního CYP1A1.

VZOREK	V [ml]	c <sub>cyp</sub> [µM]	c <sub>prot.</sub> [mg/ml]	m <sub>prot.</sub> [mg]	CELKOVÝ OBSAH CYP [nmol]	SPECIFICKÝ OBSAH CYP [nmol/mg <sub>prot.</sub> ]	VÝTĚŽEK [%]
Sféroplasty	80	15	39	3120	1200	0,4	100
Supernatant inkluzních tělísek	80	16,6	36,5	2920	1328	0,5	111
Membrány	13	68,3	53	689	888	1,3	74
Supernatant po solubilizaci	280	1,3	1,3	364	364	1	30
Finální preparát	6,25	30	2,3	14	188	13	16

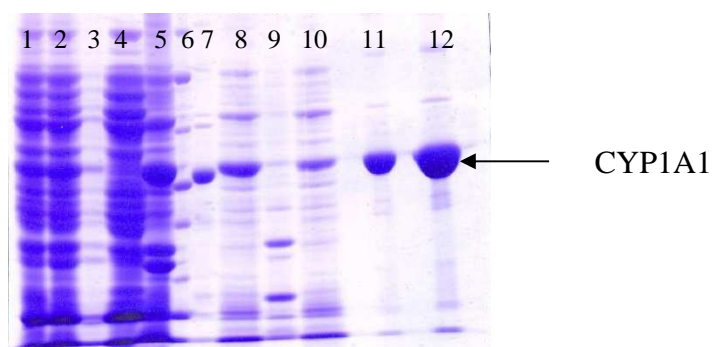


#### 4.4.2 Druhá izolace CYP1A1

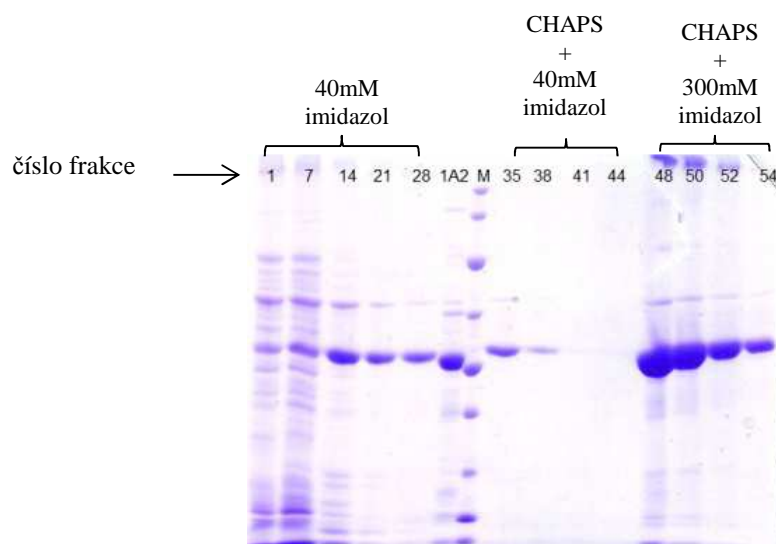
Druhá izolace ověřovala nutnost použití  $\alpha$ -NF při izolaci a dále, zda použitím buněk DH5 $\alpha$  s vneseným plasmidem pHg1 je možno nahradit ALA i ve velké produkci a zda nedojde k ovlivnění aktivity výsledného produktu CYP1A1.

Průběh obou izolací byl velmi podobný, o čemž svědčí elektroforézy (Obr. 32, 33 na str. 78), tabulka shrnující průběh purifikace (Tab. 10 na str. 78) i eluční profil, který zde právě z tohoto důvodu není uveden.

Při druhé izolaci bylo získáno 138 nmolů CYP1A1, což odpovídá výtěžku rovněž 16 %. Specifický obsah preparátu je 11,8 nmol CYP/mg<sub>prot.</sub>



**Obr. 32:** Průběh druhé izolace. 1 - sonikované sféroplasty (3  $\mu$ l); 2 - supernatant inkluzních tělísek (4  $\mu$ l); 3 - inkluzní tělíka (4  $\mu$ l); 4 - supernatant membrán (11  $\mu$ l); 5 - membrány (2  $\mu$ l); 6 - „Broad Range Protein“ marker (7  $\mu$ l) [250 / 150 / 100 / 70 / 50 / 40 / 30 / 20 / 15 / 10 / 5 kDa]; 7 - lidský rekombinantní CYP1A2 (2  $\mu$ l); 8 - solubilizát (18  $\mu$ l); 9 - peleta po solubilizaci (9  $\mu$ l); 10 - proteiny nenavázané Ni-NTA agarosou (18  $\mu$ l). 11 - finální preparát CYP1A1 (3  $\mu$ l), 12 - finální preparát CYP1A1 (10  $\mu$ l). Objem v závorkách uvádí, kolik vzorku (doplňně destilovanou vodou na objem 18  $\mu$ l) bylo přidáno ke 4x konc. vzorkovému pufru.



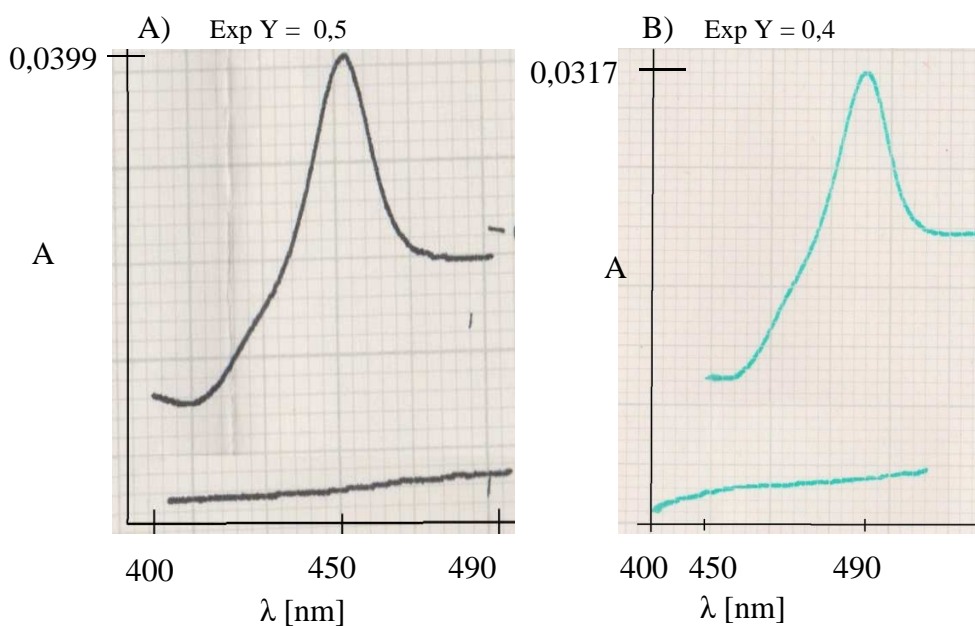
**Obr. 33:** Frakce získané z Ni-NTA agarosy. Promývání kolony puřem B1 obsahujícím 40mM imidazol (frakce 1 - 34) a puřem C obsahujícím 0,5% CHAPS (frakce 35 - 45). Eluce CYP 1A1 byla provedena pomocí puřu D s 300mM imidazolem (frakce 46 - 54). 1A2 - standard lidské CYP1A2, M - „Broad Range Protein“ marker [250 / 150 / 100 / 70 / 50 / 40 / 30 / 20 / 15 / 10 / 5 kDa].



**Tab. 9:** Celkový průběh druhé purifikace potkaního CYP1A1.

VZOREK	V [ml]	$c_{cyp}$ [ $\mu$ M]	$c_{prot.}$ [mg/ml]	$m_{prot.}$ [mg]	CELKOVÝ OBSAH CYP [nmol]	SPECIFICKÝ OBSAH CYP [nmol/mg <sub>prot.</sub> ]	VÝTĚŽEK [%]
Sféroplasty	60	14,2	35	2100	852	0,4	100
Supernatant inkluzních tělísek	60	16,6	29	1740	996	0,6	116
Membrány	7,5	80	44	330	600	1,8	70
Supernatant po solubilizaci	200	3	1,5	300	600	2	70
Finální preparát	3,45	40	3,4	12	138	11,8	16

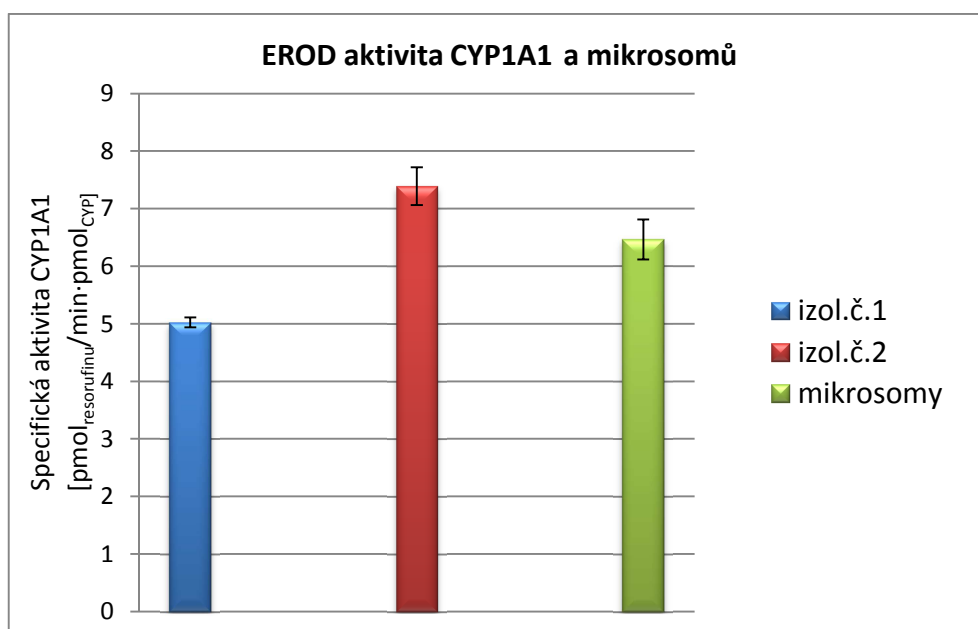
Z měření CO spekter finálních preparátů z obou izolací je zřejmé (Obr. 34), že i při izolaci bez použití  $\alpha$ -NF se v preparátu neobjevuje žádný pík při 420 nm, který by svědčil o poškození proteinu.



**Obr. 34:** CO diferenční spektrum výsledných preparátů purifikace CYP1A1. A – po první izolaci, B – po druhé izolaci. Spodní část grafu zobrazuje základní linii, horní část grafu ukazuje redukovanou formu vzorku v komplexu s oxidem uhelnatým.

## 4.5 Aktivita izolovaných CYP 1A1

Po purifikaci CYP1A1 byla u obou produktů stanovena jejich aktivita pomocí markerové reakce pro tento cytochrom, O-deethylace 7-ethoxyresorufinu (EROD aktivita). Jako pozitivní kontrola byly použity potkaní mikrosomy premedikované Sudanem I, což je induktor právě CYP1A1. Výsledky měření jsou zobrazeny na Obr. 35 a je z nich patrné, že oba preparáty jsou v rekonstituovaném systému s CPR enzymově aktivní. Vyšší aktivity však dosahoval produkt získaný při druhé izolaci. To by mohlo být způsobeno tím, že zde nebyl použit inhibitor CYP1A1  $\alpha$ -NF. V případě produktu z první izolace mohla, i přes důkladné promývání, zůstat část inhibitoru navázána v aktivním centru enzymu a mohlo tak dojít ke snížení jeho aktivity.



**Obr. 35:** EROD aktivita obou produktů izolace a mikrosomů premedikovaných Sudanem I.

## 5 Diskuse

V rámci této bakalářské práce byly použity dva geny pro potkaní cytochrom P450 1A1. Jeden, získaný darem od Prof. Strobela, byl již modifikován a vložen do plasmidu pCW. Jeho modifikace spočívala v odstranění prvních 22 aminokyselin z N- konce proteinu a jejich nahrazením hydrofobní kotvou připomínající velmi často používanou kotvu hovězího CYP17A1, aby bylo docíleno zvýšení exprese<sup>[38]</sup>. Jednou z nejdůležitějších modifikací na kotvě užívané pro expresi CYP je záměna druhé aminokyseliny za alanin. To je v souladu s Varshavského pravidlem N-konce, které popisuje stabilitu exprimovaných proteinů v živé buňce na základě jejich prvních aminokyselin<sup>[64]</sup>. Příkladem fungující bakteriální exprese CYP beze změny sekvence je exprese lidské CYP1A2, kterou provedl Kim a spol.<sup>[65]</sup>. Výše popsáný gen *CYP1A1* byl amplifikován a dále modifikován pomocí PCR reakce, v průběhu které byl stop kodon TAG (Amber) vyměněn za dva stop kodony za sebou (TAATGA – Ochre a Opal), protože sekvence TAAT je doporučena pro expresi CYP z důvodu vyššího výskytu této sekvence u bakteriálních často přepisovaných genů<sup>[38]</sup>. Většina kmenů *E. coli* schopných exprimovat CYP nese strukturní mutaci v jedné z tRNA označenou jako supE44/glnV, která na Amber kodonu může vést k vložení glutaminu na místo ukončení translace<sup>[66]</sup>. Jako další modifikace byla na C-konec proteinu pro zjednodušení purifikace vložena afinitní značka (his-tag), představovaná šesti histidiny.

Druhý gen byl získán od Mgr. M. Dvořáka. Jednalo se o nezkrácený wtCYP1A1, bez úpravy N-terminální sekvence a bez záměny druhé aminokyseliny. Navíc měl pro možnost zvýšení exprese optimalizované kodony pomocí metody „codon usage“, což ve výsledku vedlo k vysokému obsahu GC párů na počátku genu, které však nejsou pro bakterii *E.coli* optimální. Ta spíše preferuje AT páry<sup>[67]</sup>. Upravený gen byl vložený v plasmidu pET-22b. Jelikož tento plasmid pracuje na principu T7 promotoru, je tím pravděpodobně zaviněna příliš rychlá exprese proteinu a bakterie nestačí vytvářet hem, proto se zřejmě špatně poskládaný CYP vyskytuje nejvíce v inkluzních tělískách. Ve snaze zpomalit expresi a tím omezit produkci CYP do inkluzních tělísek, byl tento gen vložen do plasmidu pCW<sup>[38]</sup>. Tato snaha však nevedla k úspěchu, protože ve výsledku nebyl detekován žádný aktivní CYP1A1, a proto se od práce s tímto expresním vektorem ustoupilo.

Další část práce se věnuje optimalizaci podmínek exprese rekombinantního potkaního CYP1A1 a vychází z plasmidu pCW nesoucího modifikovaný potkaní gen pro

CYP1A1 od Prof. Strobela. Tento upravený vektor byl vždy exprimován v buňkách DH5 $\alpha$ . Jedná se o jeden z nejpoužívanějších produkčních kmenů *E. coli* [38]. Laboratorně využívané bakterie *E. coli* se historicky rozdělují na dva kmeny K-12 a B a jejich deriváty, které se od sebe liší svým genomem např. obsahem *Lon* proteasy, která zprostředkovává selektivní degradaci mutovaných a abnormálních proteinů, jakožto i inkluzních tělísek [68]. Kmen K-12, z něhož je odvozen i kmen DH5 $\alpha$ , tuto proteasu obsahuje na rozdíl od kmene B. Produkce CYP1A1 byla zkoušena i v různých růstových médiích, a to konkrétně v LB médiu a v TB médiu modifikovaném podle D. H. Kima a spol. [65]. Z měření CO spekter bylo zjištěno, že TB médium poskytuje vyšší výtěžky CYP1A1 než LB médium. To je pravděpodobně způsobeno tím, že modifikované TB médium je výživnější, protože obsahuje větší množství všech růstových složek média a navíc je pufrované poměrem fosfátových složek, což omezuje výkyvy v pH způsobené metabolickou aktivitou bakterií. [69]. Po optimalizaci heterologní exprese byla provedena velkoobjemová produkce CYP1A1 pro následující izolaci, a to za podmínek, které poskytly nejvyšší výtěžek CYP1A1. Purifikace byla provedena dle běžného protokolu. Při izolaci proteinu CYP1A1 se běžně do solubilizační směsi přidává  $\alpha$ -NF, inhibitor cytochromů P450 podrodiny 1A. Prof. Guo a Prof. Guengerich zmiňují, že přítomnost  $\alpha$ -NF je nutná pro ochranu proteinu CYP1A před denaturačním účinkem detergentů [41], jak je již zmíněno výše. To se však v našem případě nepotvrdilo. Při první izolaci CYP1A1 byl do solubilizační směsi dodán  $\alpha$ -NF na rozdíl od izolace druhé. Při porovnání CO spekter získaných finálních preparátů z obou izolací nebyly nalezeny žádné rozdíly svědčící o poškození CYP1A1 během purifikace bez přítomnosti  $\alpha$ -NF. Naopak ze stanovení enzymové aktivity vyplývá, že finální preparát získaný izolací s použitím  $\alpha$ -NF má nižší aktivitu. Je pravděpodobné, že nějaká část  $\alpha$ -NF mohla zůstat navázána v aktivním centru CYP.

$\alpha$ -NF se používá z důvodu ochrany CYP1A1 před denaturací detergenty, které byly použity pro rozrušení membrán buněk a uvolnění membránově vázaných proteinů do roztoku. Purifikaci znesnadňují proteiny, které se běžně vyskytují v bakteriích a mají přirozenou afinitu k Ni-NTA nosiči. Ty není snadné při purifikaci odstranit. Rozdělují se do třech tříd. První třídu lze odstranit promytím nosiče puforem s 80mM imidazolem, druhou třídu pomocí 55-80mM imidazolu a třetí třídu 30-50mM imidazolem [70]. Na základě toho bylo také navrženo promývání Ni-NTA kolony při první purifikaci CYP1A1, avšak ukázalo se, že se zvyšující se koncentrací imidazolu dochází ke značnému

uvolňování i čistého CYP1A1, proto bylo při následující izolaci shledáno promytí pouze 40mM imidazolem jako dostačující.

Prof. Guengerich a jeho spolupracovníci se ve svých studiích také zabývali vlivem afinitní značky his-tag a modifikací N-terminálního konce proteinu na aktivitu CYP. Jejich výsledky prokazují, že tyto změny aktivitu CYP neovlivňují<sup>[69,71]</sup>.

## 6 Závěr

Výsledky uvedené v bakalářské práci odpovídají stanoveným cílům a lze je shrnout následovně:

1) Byly připraveny a sekvenací ověřeny dva vektory nesoucí gen pro potkaní cytochrom P450 1A1 vložené do účinného expresního plasmidu pCW.

2) Funkčnost připravených vektorů byla ověřena expresí požadovaného proteinu. Jelikož produkce proteinu pomocí vektoru pCW/CYP1A1wt\_histag byla neúspěšná, tak bylo od dalších experimentů s tímto vektorem upuštěno. Byla provedena optimalizace podmínek exprese potkaního cytochromu P450 1A1. Nejvyššího stupně produkce bylo dosaženo při expresi v buňkách *E.coli* DH5 $\alpha$  při teplotě 30°C po dobu 48 hodin, kdy byla exprese iniciována přidáním IPTG do výsledné koncentrace 0,5mM po dosažení OD<sub>600</sub> 0,6 - 0,8 přičemž byla přidána ALA do výsledné koncentrace 0,5mM. Úspěšně se podařilo exprimovat také CYP1A1 bez přidané ALA za pomoci plasmidu pHg1, který exprimuje glutamyl-tRNA reduktasu, což je klíčový enzym podílející se na biosyntéze hemu v *E. coli*.

3) Exprimovaný membránový cytochrom P450 1A1 s N-terminální modifikací byl solubilizován a purifikován pomocí afinitní chromatografie na Ni-NTA agarose v dostatečném množství a čistotě. Také bylo zjištěno, že pro izolaci cytochromu P450 1A1 není potřeba použít inhibitor  $\alpha$ -NF. Detekovaná EROD aktivita u obou produktů izolace potvrdila, že získané preparáty CYP1A1 jsou enzymově aktivní.

Předkládaná bakalářská práce přináší výsledky, které doplňují metodiku heterologní exprese a purifikace v laboratoři.

## Seznam použité literatury

1. Stiborová M., Hudeček, J., Páca, Jr., Martínek, V., Páca, J. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy*, 98, 876 – 890.
2. URL: <http://www.uzis.cz/category/edice/publikace/zdravotnicka-statistika> [Přístup květen. 12, 2013].
3. Alexander, L. S., Goff, H. M. (1982) Chemicals, Cancer, and Cytochrome P-450. *Journal of Chemical Education*, 59 (3), 179-181.
4. Wu, Y., Liu, X., Zhang, L., Wang, Ch. (2011) An amperometric biosensor based on rat cytochrome P450 1A1 for benzo[a]pyrene determination. *Biosensors and Bioelectronics* 26(5), 2177-2182.
5. Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T. (2000) Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. Listy*, 94, 913- 918.
6. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy*, 93, 229-237.
7. Garfinkel, D. (1958) Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Archives of biochemistry and biophysics*, 77(2), 493-509.
8. Klingenberg, M. (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 75(2), 376-386.
9. Omura, T., Sato, R. (1962) A new cytochrome in liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, 237(4), 1375-1376.
10. Bernhardt, R. (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of biotechnology*, 124(1), 128-145.
11. Werck-Reichhart, D., Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, 1(6), 3003-1.
12. Meunier, B., de Visser, S. P., Shaik, S. (2004) Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem. Rev.*, **104**, 3947-3980.
13. Skopalík, J., Anzenbacher, P., Otyepka, M., (2008) Flexibility of Human Cytochromes P450: Molecular Dynamics Reveals Differences between CYPs 3A4, 2C9 and 2A6 which Correlate with Their Substrate Preferences. *The journal of physical chemistry B*, 112(27), 8165-8173.

14. Omura, T. (2006) Mitochondrial P450s. *Chemico-biological interactions*, 163(1), 86-93.
15. De Lemos-Chiarandini, C., Frey, A. B., Sabatini, D. D., Kreibich, G. (1987) Determination of the membrane topology of the phenobarbital-inducible rat liver cytochrome P-450 isoenzyme PB-4 using site-specific antibodies. *The Journal of cell biology*, 104(2), 209-219.
16. Neve, E. P., Eliasson, E., Pronzato, M. A., Albano, E., Marinari, U., Ingelman-Sundberg, M. (1996) Enzyme-specific transport of rat liver cytochrome P450 to the Golgi apparatus. *Archives of biochemistry and biophysics*, 333(2), 459-465.
17. Kaderbhai, M. A., Ugochukwu, C. C., Lamb, D. C., Kelly, S. L. (2000) Targeting of Active Human Cytochrome P4501A1 (CYP1A1) to the Periplastic Space of *Escherichia coli*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 279, 803-807.
18. Nebert, D. W., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Kemper, B., Levin, W. (1987) The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA*, 6(1), 1-11.
19. Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., Nebert, D. W. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6(1), 1-42.
20. Nelson, D. R. (2011) Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics*, 1814(1), 14-18.
21. Nebert, D. W., Russell, D. W. (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *The Lancet*, 360(9340), 1155-1162.
22. Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G., Schlichting, I. (2005) Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chemical reviews*, 105(6), 2253-2278.
23. Williams, J. A., Hyland, R., Jones, B. C., Smith, D. A., Hurst, S., Goosen, T. C., Ball, S. E. (2004) Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC<sub>i</sub>/AUC) ratios. *Drug metabolism and disposition*, 32(11), 1201-1208.
24. URL: [http://gepard.bioinformatik.uni-saarland.de/old\\_html/html/ModMethDrugDiscWS0607/V10\\_CYP450.pdf](http://gepard.bioinformatik.uni-saarland.de/old_html/html/ModMethDrugDiscWS0607/V10_CYP450.pdf) [Přístup květen. 22, 2013].



25. Krest, C. M., Onderko, E. L., Yosca, T. H., Calixto, J. C., Karp, R. F., Livada, J., Rittle, J., Green, M. T. (2013) Reactive intermediates in cytochrome P450 catalysis. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 1-12.
26. Guengerich, F. P., Isin, E. M. (2008) Mechanisms of cytochrome P450 reactions. *Acta chimica slovenica*, 55(1), 7.
27. Zanger, U. M., Schwab, M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression. *Pharmacology & Therapeutics*, 138, 103–141.
28. Walsh, A. A., Szklarz, G. D., Scott, E. E. (2013) Human Cytochrome P450 1A1 Structure and Utility in Understanding Drug and Xenobiotic Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 288(18), 12932-12943.
29. URL: <http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a1.htm> [Přístup květen. 12, 2013].
30. Hayashi, S. I., Watanabe, J., Nakachi, K., Kawajiri, K. (1991) Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. *Journal of Biochemistry*, 110(3), 407-411.
31. Xu, X., Kelsey, K. T., Wiencke, J. K., Wain, J. C., & Christiani, D. C. (1996) Cytochrome P450 CYP1A1 MspI polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 5(9), 687-692.
32. Shimada, T., Yamazaki, H., Foroozesh, M., Hopkins, N. E., Alworth, W. L., Guengerich, F. P. (1998) Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1. *Chemical research in toxicology*, 11(9), 1048-1056.
33. URL: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4I8V> [Přístup duben. 18, 2013].
34. Cornelissen, S., Julsing, M. K., Schmid, A., Bühler, B. (2012) Comparison of microbial hosts and expression systems for mammalian CYP1A1 catalysis. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39(2), 275-287.
35. URL: <http://www.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Exprese-rekombinantnich-proteinu-teoreticky-zaklad.pdf> [Přístup duben. 17, 2013].
36. Yun, C. H., Yim, S. K., Kim, D. H., & Ahn, T. (2006) Functional expression of human cytochrome P450 enzymes in *Escherichia coli*. *Current drug metabolism*, 7(4), 411-429.
37. Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 411-421.
38. Barnes, H. J. (1996) Maximizing Expression of Eukaryotic Cytochrome P450s in *Escherichia coli*. *Methods in enzymology*, 272, 3-14.

39. Ahn, T., Yang, S., & Yun, C. H. (2004) High-level expression of human cytochrome P450 1A2 by co-expression with human molecular chaperone HDJ-1 (Hsp40). *Protein expression and purification*, 36(1), 48-52.
40. Ahn, T., Yang, S., & Yun, C. H. (2004) Enhanced expression of human cytochrome P450 1A2 by co-expression with human molecular chaperone Hsp70. *Toxicology letters*, 153(2), 267-272.
41. Guo, Z., Gillam, E. M., Ohmori, S., Tukey, R.H., Guengerich, F.P. (1994) Expression of modified human cytochrome P450 1A1 in *Escherichia coli*: effects of 5' substitution, stabilization, purification, spectral characterization, and catalytic properties. *Archives of biochemistry and biophysics*, 312(2), 436-446.
42. Chun, Y. J., Shimada, T., & Guengerich, F. P. (1996) Construction of a human cytochrome P450 1A1: rat NADPH-cytochrome P450 reductase fusion protein cDNA and expression in *Escherichia coli*, purification, and catalytic properties of the enzyme in bacterial cells and after purification. *Archives of biochemistry and biophysics*, 330(1), 48-58.
43. Kaderbhai, M. A., Ugochukwu, C. C., Lamb, D. C., & Kelly, S. L. (2000) Targeting of Active Human Cytochrome P4501A1 (CYP1A1) to the Periplasmic Space of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(3), 803-807.
44. Harnastai, I. N., Gilep, A. A., Usanov, S. A. (2006) The development of an efficient system for heterologous expression of cytochrome P450s in *Escherichia coli* using *hemA* gene co-expression. *Protein expression and purification*, 46(1), 47-55.
45. URL: <http://biologie.upol.cz/metody/Klonovani%20DNA.htm> [Přístup duben. 17, 2013].
46. URL: <http://wolfson.huji.ac.il/expression/commercial-vectors/pet-22b-map.pdf> [Přístup květen. 10, 2013].
47. URL: <http://www.yrbio.com/bioresource/sites/yrbio.com.bioresource/files/document/vector/226411/c183-001.pdf>
48. Hansen, L. H., Knudsen, S., Sørensen, S. J. (1998) The effect of the *lacY* gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *Curr. Microbiol.* 36(6), 341-7.

49. Gegner, J. A., Dahlquist, F. W. (1991) Signal transduction in bacteria: CheW forms a reversible complex with the protein kinase CheA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(3), 750-754.
50. De Boer, H. A., Comstock, L. J., Vasser, M. (1983) The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(1), 21-25.
51. Kalnins, A., Otto, K., Rüther, U., Müller-Hill, B. (1983) Sequence of the lacZ gene of *Escherichia coli*. *The EMBO journal*, 2(4), 593.
52. Wolf, C. H., Friedberg, T.H., Pritchard, M.P. (2003) Cytochrome P450 expression in *enterobacteria* (US 2003/0215915 AI, United States Patent and Trademark Office).
53. Dvořák M. (2011) Příprava rekombinantního cytochromu P450 1A1 (Diplomová práce, Katedra biochemie, PřF UK, Praha).
54. Stráňava M. (2012) Heterologní exprese NADPH:cytochrom P450 reduktasy (Diplomová práce, Katedra biochemie, PřF UK, Praha).
55. URL: <http://www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp> [Přístup duben 28, 2013].
56. URL: <https://www.neb.com/products/n3200-2-log-dna-ladder-01-100-kb> [Přístup květen 10, 2013].
57. Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-5.
58. Omura T., Sato R. (1964) The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378.
59. Wiechelman, K. J., Braun, R. D., Fitzpatrick, J. D. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical biochemistry*, 175(1), 231-237.
60. URL: <http://www.ok.cz/dkitt/> [Přístup duben. 28, 2013].
61. Burke, M. D., Mayer, R. T. (1974) Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition*, 2(6), 583-588.
62. Cvrk, T., Strobel, H. W. (2001) Role of THR501 residue in substrate binding and catalytic activity of cytochrome P4501A1. *Archives of biochemistry and biophysics*, 389(1), 31-40.

63. Xiaoli Dong, Paul Stothard, Ian J. Forsythe, and David S. Wishart "PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps" *Nucleic Acids Res.* 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W660-4.
64. Varshavsky, A. (1997) The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes to Cells*, 2(1), 13-28.
65. Kim, D. H., Kim, K. H., Isin, E. M., Guengerich, F. P., Chae, H. Z., Ahn, T., & Yun, C. H. (2008) Heterologous expression and characterization of wild-type human cytochrome P450 1A2 without conventional N-terminal modification in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*, 57(2), 188-200.
66. Eggertsson, G., & Söll, D. (1988) Transfer ribonucleic acid-mediated suppression of termination codons in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews*, 52(3), 354.
67. Stormo, G. D., Schneider, T. D., Gold, L. M. (1982) Characterization of translational initiation sites in *E. coli*. *Nucleic Acids Research*, 10(9), 2971-2996.
68. URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/P0A9M0> [Přístup květen. 20, 2013].
69. URL: <http://www.p-lab.cz/katalog.pl?akce=polozka&id=3237> [Přístup květen. 20, 2013].
70. Bolanos-Garcia, V. M., Davies, O. R. (2006) Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1760(9), 1304-1313.
71. Yun, C. H., Miller, G. P., Guengerich, F. P. (2000) Rate-determining steps in phenacetin oxidations by human cytochrome P450 1A2 and selected mutants. *Biochemistry*, 39(37), 11319-11329.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]